

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. W. Kersten

Analyse des Glucosetransportsystems
von Escherichia coli zur Klärung des
Mechanismus der induzierbaren Resistenz
gegen α -Methylglucosid

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Gabriela Bullmer
aus Oberkirch

1984

1984 # 93



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546228_0015

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. W. Kersten

Analyse des Glucosetransportsystems von Escherichia coli zur Klärung des Mechanismus der induzierbaren Resistenz gegen α -Methylglucosid

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Gabriela Bullmer
aus Oberkirch

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf

Referent: Prof. Dr. A. Ogilvie

Korreferent: Prof. Dr. W. Kersten

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.1984

Die vorliegende Arbeit wurde unter der
Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Ogilvie
Institut für Physiologische Chemie
an der Universität Erlangen-Nürnberg
durchgeführt.

Für Albert und Monika

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I Einleitung	1
II Materialien und Methoden	
1. Chemikalien	3
2. Technisches Zubehör und Geräte	4
3. Kulturmedien	5
4. Puffer und Lösungen	6
5. Bakterienstämme und Wachstumsbedingungen	8
6. Messung der Proteinsynthese und der RNA Synthese	10
7. Bestimmung des Nukleotid Pools	11
8. Dünnschichtchromatographische Trennung der Nukleotide	12
9. Kinetiken	13
10. Membranpräparation	14
11. Membranpräparation von ^{35}S -Methionin markierten Bakterien	17
12. Gelelektrophorese	18
III Ergebnisse	
1. Wirkung von α -Methylglucosid auf das Wachstum der Bakterien bei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen	21
2. Reversibilität der Wirkung von α -Methylglucosid	27
3. Aufhebung der Wirkung von α -Methylglucosid durch unterschiedliche Aminosäuregemische	33
4. Adaptation der Bakterien an α -Methylglucosid	38
5. Kinetische Charakterisierung des Glucosetransports bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien	46

	Seite
6. Änderung des Km von Glucose bei Hemmung der ^{14}C -Glucoseaufnahme mit α -Methylglucosid	53
7. Bestimmung des Km von α -Methylglucosid bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien	63
8. Die Bildung von ppGpp nach Gabe von α -Methyl- glucosid	71
9. Unterschiede im Proteinmuster der inneren und äußeren Membran und des Cytosols bei Kontroll- bakterien und bei adaptierten Bakterien	78
IV Zusammenfassung	83
V Diskussion	85
Literaturverzeichnis	91

I Einleitung

Das Zuckeranalogon α -Methylglucosid wird von *Escherichia coli* kompetitiv zur Glucose transportiert. Die Bakterien können α -Methylglucosid zwar phosphorylieren aber nicht weiter metabolisieren (1). Auf diese Weise gelangt weniger Glucose in die Zelle und es entsteht ein Energiemangel, der das Wachstum der Bakterien hemmt. Zunächst sollte diese Wachstumshemmung - ihre Konzentrationsabhängigkeit, die Reversibilität dieser Hemmung und die Überwindung dieser Hemmung durch verschiedene Aminosäuregemische untersucht werden. Da nach einer gewissen Zeit die Bakterien die Wachstumshemmung von sich aus überwinden und langsam weiterwachsen, wurde in dieser Arbeit auch untersucht, ob sich die Bakterien an α -Methylglucosid gewöhnen können (Phänomen der Adaptation). Es sollten genauere Untersuchungen über die Bedingungen, die zur Adaptation führen und über die Reversibilität der Adaptation, folgen. Weiter sollte die Frage nach dem Mechanismus geklärt werden, der zur Adaptation führt. Dazu wurde der Glucosetransport und der α -Methylglucosidtransport näher betrachtet und kinetisch charakterisiert (Bestimmung des K_m und v_{max} des Glucose-transportes und des α -Methylglucosidtransportes bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien). Bei der Frage nach dem Mechanismus der Adaptation wurde auch eine Strukturänderung der Membran in Erwägung gezogen. Es wurden



bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien die innere und äußere Membran präpariert und bei der Trennung der Proteine auf Unterschiede im Bandenmuster bei Kontrollzellen und bei adaptierten Zellen untersucht.

II Materialien und Methoden

1. Chemikalien

Das 1-O-Methyl- α -D-Glucopyranosid (α -Methylglucosid bzw. α -MG) wurde von der Fa. Sigma (St. Louis, USA - München) bezogen.

Von der Fa. Serva stammen Acrylamid; N,N'-Methylen-bisacrylamid; Bromphenolblau; N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin und Coomassie R 250.

Natriumdodecylsulfat wurde bei BIO.RAD, Ammoniumperoxidisulfat bei Roth und β -Mercaptoäthanol bei Fluka gekauft.

Die Fa. Boehringer (Mannheim) lieferte das Chloramphenicol.

Die radioaktiven Substanzen wurden bei The Radiochemical Centre (Amersham, Great Britain) gekauft.

^{14}C -Lysin	(CFB 69)	312 mCi/mmol	50 $\mu\text{Ci}/0,8 \text{ ml}$
^{14}C -Arginin	(CFB 63)	324 mCi/mmol	50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$
^{14}C -Glucose	(CFB 96)	284 mCi/mmol	200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$
		268 mCi/mmol	200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$

Methyl- α -D- ^{14}C -Gluco-Pyranosid (α -Methyl- ^{14}C -Glucosid)			
	(CFB 76)	291 mCi/mmol	200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$
		184 mCi/mmol	200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$

^3H -Uridin	(TRK 178)	25 Ci/mmol	1 mCi/ml
^{35}S -Methionin		1370 Ci/mmol	5,35 mCi/ml
^{32}P -Orthophosphat			10 mCi/ml

Alle übrigen - hier nicht gesondert aufgeführten - Chemikalien wurden in pro analysi Qualität bei der Fa. Merck (Darmstadt) beschafft.

2. Technisches Zubehör und Geräte

2.1. Technisches Zubehör

Zur Messung der Protein- und RNA Synthese wurden Papierfilter (ϕ 23 mm) und für die Kinetiken Membranfilter (Selectron-Filter, ϕ 25 mm, PG 0,45 μ m) der Fa. Schleicher+Schüll verwendet.

Für die chromatographische Trennung der Nukleotide wurden (PEI)-DC-Fertigplatten Cellulose F (mit Fluoreszenzindikator) der Fa. Merck benutzt.

Die Röntgenfilme - Typ Osray T4 - für die Autoradiographie wurden bei der Fa. Agfa (Gevaert) gekauft.

Vom Tetenal Photowerk (Hamburg-Berlin) wurden der Röntgen Rapidentwickler und das Superfix bezogen.

Die Gele wurden auf Aquarellpapier (Hahnemühle, Aquarell-Bütten, Selecta, Schleicher+Schüll, matt) aufgetrocknet.

Das PPO (2,5-Diphenyloxazol) und das POPOP (1,4-Di(2-(4-methyl-5-phenyloxazol))benzol) für die Flüssigkeitszintillationszählung wurde von der Fa. Zinsser (Frankfurt) geliefert.

2.2. Geräte

Zum Aufschluß der Zellen mit Ultraschall (bei der Membranpräparation) wurde der Sonifier der Fa. Branson Sonic Power Company (Danbury, USA) verwendet.

Zum Trocknen der Gele wurde ein Gerät von Hoefer Scientific Instruments, Modell SE 540 benützt.

Die radioaktiv markierten Proben wurden in einem Flüssigkeitsszintillationszähler der Fa. Packard (Downers Grove, USA) gezählt.

3. Kulturmedien

3.1. Nakada_Medium (13)

In einem Liter Wasser wurden 6,0 g KH_2PO_4 ; 11,76 g Na_2HPO_4 ; 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 ml MnSO_4 (3,3 mg/ml); 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ gelöst. Als Kohlenstoffquelle wurde im allgemeinen 1g Glucose verwendet. Außerdem wurden auch 4g Glucose und 0,2% Glycerin (2,3 ml einer 87% Glycerinlösung) benützt. Mit 10N NaOH wurde auf pH 7 eingestellt.

3.2. TG_Medium (14)

Es wurden 4,67 g NaCl; 1,49 g KCl; 50 μl FeCl_3 (0,54 $\mu\text{g/ml}$); 0,355 g Na_2SO_4 und 2,0 ml K_2HPO_4 (57 mg/ml) in 1l Wasser gelöst. Als Kohlenstoffquelle diente 1g Glucose; mit HCl wurde auf pH 7,5 eingestellt.

3.3. Minimal - Agar - Platten

In 1l Nakada Medium (4g Glucose) wurden 15g Agar-Agar eingerührt. Nach dem Sterilisieren wurde der Agar bei

60°C - 70°C in Petrischalen abgefüllt. Nach dem Abkühlen wurden die Platten mit dem Deckel nach unten 24h lang bebrütet; dann wurden die Agarplatten im Kühlraum bei +4°C aufbewahrt.

1. Puffer und Lösungen

4.1. α-Methylglucosidlösung (α-MG-Lösung)

0,5g α-MG wurden in 1ml Aqua bidest. gelöst; dabei trat eine Volumenvergrößerung auf, so daß 0,36g α-MG pro ml Lösung resultierten, also eine 1,85M α-MG-Lösung eingesetzt wurde.

4.2. Nakada Puffer

Der Puffer hatte dieselbe Zusammensetzung wie das Nakada Medium, jedoch ohne Glucose bzw. ohne Glycerin.

4.3. Aminosäurengemische (AS)

Die Aminosäurengemische wurden in einer $5 \cdot 10^{-3}$ M Lösung hergestellt.

AS : Aminosäurengemisch, das alle 20 Aminosäuren enthält.

AS-Leu : Aminosäurengemisch, das alle Aminosäuren enthält bis auf Leucin.

AS-Phe : Aminosäurengemisch, das alle Aminosäuren enthält bis auf Phenylalanin, usw.

4.4. Fließmittel

Zur dünnstschichtchromatographischen Trennung der Nukleotide wurde eine 1,5M KH_2PO_4 Lösung pH 3,4 benutzt.

4.5. Puffer zur Membranpräparation

4.5.1. Puffer A: 10 mM NaH_2PO_4 pH 7,0 (138 mg/100ml)

4.5.2. Puffer B: 50 mM NaH_2PO_4

10 mM MgCl_2 pH 7,0

4.5.3. Auftragspuffer: 0,0625M TRIS-HCl-Lösung pH 6,8

2% (w/v) Natriumdodecylsulfat

10% (v/v) Glycerin

0,001% (w/v) Bromphenolblau

5% (v/v) β -Mercaptoäthanol

4.6. Lösungen zur Gelelektrophorese

4.6.1. Stammlösung I : 100 ml Wasser enthielten

0,8 g Methylenbisacrylamid

44 g Acrylamid

4.6.2. Stammlösung II: In 100 ml Wasser wurden

0,8 g Methylenbisacrylamid und

30 g Acrylamidin gelöst.

4.6.3. Färbepfadstammlösung: 14% (w/v) Trichloressigsäure

0,01% (w/v) Coomassie R 250

14,4% (v/v) Essigsäure

4.7. Toluol - Szintillationsflüssigkeit

In 11 Toluol wurden 5 g PPO und 0,3 g POPOP gelöst.

5. Bakterienstämme und Wachstumsbedingungen

5.1. Bakterienstämme

Die Experimente wurden mit *E. coli* MRE 600 durchgeführt; zum Teil wurden die Versuche auch mit *E. coli* PA1 (rel⁻) durchgeführt.

5.2. Wachstumsbedingungen

Die Bakterien wurden auf Minimal - Agar - Platten, die nicht älter als vier Wochen waren, bei +4°C im Kühlraum gelagert. Am Abend vor dem jeweiligen Experiment wurde eine Kolonie in ca. 10 ml Nakada Medium in einen Seitenarmkolben steril überimpft und bei 37°C auf einem Rotationsschüttelbrett (ca. 250 Umdrehungen/Minute) aerob angezüchtet. Für den Versuch wurde aus dieser Übernachtskultur eine geringe Menge überimpft. Bei PA1 wurde dem Medium Arginin (0,1 g/l) und Thiamin (0,1 mg/l) zugegeben. Das Wachstum der Bakterien wurde durch Messen der Extinktion E (bzw. der "optischen Dichte" OD) in einem Eppendorffphotometer bei einer Wellenlänge von 578 nm verfolgt (1 ml Bakteriensuspension bei $E_{578} = OD_{578} = 1,0$ enthält ca. 10^9 Bakterien). Bei MRE 600 wurde eine Generationszeit von ca. 45 Minuten, bei PA1 von ca. 55 Minuten beobachtet. Für die Versuche wurden die Bakterien in exponentieller Wachstumsphase verwendet.

5.3. Wachstumsversuche

Aus einer Übernachtskultur wurden Bakterien in 30 ml Nakada Medium je Seitenarmkolben überimpft, so daß $OD_{578} = 0,05$ resultierte. Das Wachstum wurde bis $OD_{578} = 0,2$ verfolgt, dann wurde die Kultur so verteilt, daß sich pro Ansatz in einem Seitenarmkolben 5 ml Bakteriensuspension befanden. Die Zugabe von α -MG erfolgte i.a. bei $OD_{578} = 0,3$; die Zugabe von Aminosäuregemischen bei $OD_{578} = 0,25$ oder eine halbe Stunde nach der α -MG Zugabe. Nach der Zugabe wurde die Extinktion in Abständen von 15 Minuten gemessen.

5.4. Züchtung von adaptierten Bakterien

Zum Erhalt von adaptierten Bakterien wurde pro 5 ml Kultur 290 μ l α -MG-Lösung zugegeben; dies entsprach einer Konzentration von 101 mM α -MG. Die Lösung wurde bei $OD_{578} = 0,3$ zugefügt. Bei dieser Konzentration wurde das Wachstum der Bakterien für ca. 2 Stunden gehemmt (d.h. $OD_{578} = \text{konstant}$); danach wuchsen die Bakterien langsam weiter. Nachdem die Kultur $OD_{578} = 0,6$ erreicht hatte, wurden die Bakterien als adaptiert bezeichnet (Beweis im Ergebnisteil).

6. Messung der Proteinsynthese und der RNA Synthese

Zur Messung der Proteinsynthese und der RNA Synthese wurden die Aufnahme von radioaktiv markiertem Lysin oder Arginin und radioaktiv markiertem Uridin in säurefällbares Material in einem "Doppelmarkierungs"-Versuch gemessen.

Der Doppelmarkierungsversuch fand in einem speziell konstruierten Wasserbad (Versuchstemperatur 37°C) mit Magnetrührvorrichtung in kleinen Glasgefäßen statt. Während der gesamten Versuchsdauer wurde mit Magnetrührfischen gerührt. Pro Ansatz wurden in das Einbaugefäß je 5 μl ^3H -Uridin (spezifische Aktivität im Ansatz 50 mCi/mmol), 5 μl 0,02 M Uridin, 5 μl ^{14}C -Lysin (spez. Aktivität im Ansatz 0,625 mCi/mmol), 5 μl 0,1 M Lysin oder 5 μl ^{14}C -Arginin (spez. Aktivität im Ansatz 0,5 mCi/mmol) und 5 μl 0,1 M Arginin pipettiert und ca. 5 Minuten vor dem Start im Wasserbad vorgewärmt. Aminosäuregemische wurden ebenfalls schon vor dem Start in das Einbaugefäß pipettiert.

Gestartet wurde mit 1 ml Bakteriensuspension $\text{OD}_{578} = 0,25$ bei einer Temperatur von 37°C . Der Einbau wurde über 60 - 90 Minuten verfolgt. In Abständen von 5 - 10 Minuten wurden Proben von je 50 μl auf Papierfilter pipettiert und sofort in eiskalte 10% (w/v) TCA (Trichloressigsäure) gegeben, 15 Minuten nach Beendigung der Entnahmen wurden die Filter dreimal in 2,5% TCA, dann in Äthanol, anschließend in einem Äthanol/Äther Gemisch (1:1, v/v) und schließlich noch in reinem Äther gewaschen. Zwischen den einzelnen Schritten

wurden die Filter auf saugfähiges Papier ausgelegt, Zum Schluß wurden die Filter ca. 10 Minuten im Trockenschrank bei 60°C getrocknet und dann in 5 ml Toluol-Szintillationsflüssigkeit in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Dabei war der ^{14}C -Kanal so eingestellt, daß kein Tritium mitgezählt wurde. Der Fehler, der durch ^{14}C im Tritiumkanal entstand (ca. 18 %) wurde wegen des Aktivitätsverhältnisses $^3\text{H}:^{14}\text{C}$ (mindestens 10:1) nicht korrigiert.

7. Bestimmung des Nukleotid Pools

Zur Bestimmung der Nukleotide ATP, GTP und ppGpp wurde die Aufnahme von ^{32}P -Orthophosphat gemessen. Der Einbauversuch fand - wie die Aufnahme von ^3H -Uridin und ^{14}C -Aminosäuren - im Wasserbad bei 37°C in Glasgefäßen mit Rührfischen statt. Für den $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ -Einbau wurden die Bakterien aus einer Übernachtskultur (Nakada Medium, 1 g Glucose) zunächst in frisches Nakada Medium überimpft. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Bakterien filtriert, dabei wurde mit TG Medium gut gespült; dann wurden die Bakterien in dem phosphatarmen TG Medium (1 g Glucose) gezüchtet. Für den Versuch wurden die Bakterien in exponentieller Wachstumsphase verwendet. In die Einbaugeschläuche wurde pro Ansatz je nach Aktivität 20 - 30 µl $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ pipettiert (spezifische Aktivität im Ansatz 250 - 350 mCi/mmol). Die Zugabe von α -MG fand 30 Minuten nach dem Start statt, 2 Minuten vorher wurden die Aminosäuregemische zugegeben.

Gestartet wurde mit 1 ml Bakteriensuspension bei $OD_{578} = 0,25$ und 37°C . Der Einbau wurde über 55 Minuten verfolgt; die Entnahmen erfolgten in 1 ~ 5 Minuten Abständen. Entnommen wurden je 50 μl in Microtubes der Fa. Eppendorf, die 60 μl 2N HCOOH und je 0,55 mg/ml ATP und GTP als Marker enthielten, und je 20 μl auf Papierfilter, die sofort in eiskalte 10 % TCA gegeben wurden. Die Papierfilter wurden wie in II.6 behandelt. Die Microtubes wurden 15 Minuten auf Eis belassen und anschließend in einer Sarstedt Tischzentrifuge 10 Minuten lang abzentrifugiert.

8. Dünnschichtchromatographische Trennung der Nukleotide

Nach der Zentrifugation (II.7) wurden je 10 μl des Überstandes auf PEI-DC-Cellulose F Fertigplatten im Startpunkt aufgetragen (maximal 12 Proben pro Platte). Nach dem Trocknen wurden sie in DC-Kammern gegeben, die als Laufmittel 1,5M KH_2PO_4 (pH 3,4) enthielten. Nach einer Laufzeit von ca. 2 1/2 h stand die Front ca. 2 cm unter dem oberen Plattenrand. Die Platten wurden nun mit kalter Luft (Fön) getrocknet, dann auf Röntgenfilme aufgelegt. Diese wurden etwa 12 - 36 h belichtet. Mittels der Autoradiographie wurde auf den Platten ATP, GTP und ppGpp identifiziert (ATP und GTP konnten wegen des Fluoreszenzindikators auf den Platten vorher unter UV-Licht gefunden werden). Die entsprechenden "Spots" wurden aus den Platten ausgekratzt und mit 5 ml Toluol-Szintillator gezählt.

9. Kinetiken

Die Aufnahmekinetiken von ^{14}C -Glucose und α -Methyl- ^{14}C -Glucosid wurden bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien gemessen. Dazu wurden je 20 ml Bakterien (Nakada Medium, 1 g Glucose) gezüchtet. Der Versuch fand bei $\text{OD}_{578} = 0,6$ statt. Bei dieser optischen Dichte wurden 20 ml Bakterien im Kühlraum in einer Sorvall Zentrifuge 10 Minuten bei 10000 rpm abzentrifugiert - den Kontrollbakterien wurde unmittelbar vor der Zentrifugation α -MG (290 μl /5 ml Bakterien; Endkonzentration 101mM) zugegeben. Nach dem Dekantieren wurde das Pellet zwei mal mit Nakada Puffer gewaschen (dazwischen 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert). Nun wurde das Pellet in 2 ml (1/10 der ursprünglichen Menge) Nakada Puffer suspendiert und auf Eis aufbewahrt.

Vor dem Start wurde die benötigte Menge der Bakterien 1:10 mit Nakada Puffer verdünnt ($\rightarrow \text{OD}_{578} = 0,6$) und 5 Minuten in einem Wasserbad (25°C) vorgewärmt. Der Versuch selbst fand bei Zimmertemperatur statt. Die Aufnahmekinetik fand in einem Einbauglasgefäß mit Rührmagneten statt. Während des ganzen Versuchs wurde mit einem Magnetrührer gerührt.

Bei der Aufnahmekinetik von ^{14}C -Glucose wurden pro Ansatz 1,8 - 34,4 μM (45 mCi/mmol), 1,4 - 5 μM und 70 - 340 nM (284 mCi/mmol) ^{14}C -Glucose in das Einbauglas gegeben. Zusätze wie Chloramphenicol (100 $\mu\text{g/ml}$) und α -MG wurden ebenfalls vor dem Start zugegeben. Proben von je 100 μl wurden 15, 30, 45, 60 und 180 Sekunden nach dem Start entnommen.

Bei der Aufnahmekinetik von α -Methyl- ^{14}C -Glucosid wurden pro Ansatz 54 - 260 μM (3,7 mCi/mmol), 19 - 105 μM (5,2 mCi/mmol), 18 - 86 μM (17 mCi/mmol), 3,4 - 33 μM (49 mCi/mmol), 2,7 - 14 μM (110 mCi/mmol), und 0,082 - 1,6 nM (184 mCi/mmol) α -Methyl- ^{14}C -Glucosid in das Einbaugesäß gegeben. Proben von je 100 μl wurden nach 1/2, 1, 2, 3, 5 und 10 Minuten entnommen.

Der Start erfolgte mit 1 ml vorgewärmten Bakterien ($\text{OD}_{578} = 0,6$; 25°C). Es wurden Proben von je 100 μl entnommen, über Membranfilter mit der Milipore Filtrieranlage filtriert und sofort zweimal mit ca. 5 ml Nakada Puffer gespült. Für das Waschen wurden etwa 20 Sekunden benötigt. Anschließend wurden die Filter getrocknet und mit 5 ml Toluol-Szintillator gezählt.

10. Membranpräparation

Die Präparation der Gesamtmembran wurde bei Kontrollbakterien und adaptierten Bakterien (je 1 g) vorgenommen (20). Zum Erhalt von 1 g Kontrollzellen wurden aus einer Übernachtskultur MRE 600 in 1000 ml Nakada Medium, 1 g Glucose überimpft. Das Wachstum wurde bis $\text{OD}_{578} = 0,9$ kontrolliert, dann wurden die Bakterien 30 Minuten bei 10000 rpm in einer Sorvall abzentrifugiert. Das Pellet wurde in eiskalte 0,9 % NaCl Lösung aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Nach dem Dekantieren wurden die Bakterien sofort bei -80°C eingefroren.

Für 1 g adaptierte Bakterien wurden auch 1000 ml angezüchtet; insgesamt wurden 56 ml α -MG-Lösung zugegeben (dies entsprach einer Endkonzentration von 98 mM). Zunächst wurden 100 ml Bakterien angezüchtet, bei $OD_{578} = 0,3$ wurden 5,6 ml α -MG-Lösung zugegeben. Nun wurde das Wachstum bis $OD_{578} = 0,6$ verfolgt, dann wurden die Bakterien mit 100 ml Nakada Medium (37°C) verdünnt ($OD_{578} = 0,3$) und sofort wieder 5,6 ml α -MG-Lösung zugegeben. Nach erneuter Wachstumskontrolle wurde bei $OD_{578} = 0,6$ mit 200 ml Nakada Medium verdünnt und 11,2 ml α -MG-Lösung zugegeben. Als die Bakterien jetzt wieder $OD_{578} = 0,6$ erreicht hatten, wurde das restliche Nakada Medium (600 ml) und die verbliebene α -MG-Lösung (33,6 ml) zugegeben. Bei $OD_{578} = 0,9$ (Wachstum wurde kontrolliert) wurde wie mit den Kontrollbakterien verfahren.

Am nächsten Tag wurden die eingefrorenen Kontroll- und adaptierte Bakterien aufgetaut und wie folgt behandelt:

Je 0,5 g Bakterien in 4 ml eiskaltem Puffer A suspendieren.

Mit dem Sonicator die Zellen aufschließen (3 x 30 Sekunden bei 50 - 70 Watt).

Die Zelltrümmer 20 Minuten bei 8000 rpm abzentrifugieren (Sorvall, Kühlraum).

Den Überstand mit der Kontron Ultrazentrifuge (TST 54 Rotor 6 x 5 ml) 1 h bei 43000 rpm abzentrifugieren (rot.temp. 4°C, temp. limit 25°C, brake on).

Überstand (= Cytosol) bei -80°C aufbewahren,

Pellet mit Puffer A waschen und wieder 1 h bei 43000 rpm (Kontron, TST 54 Rotor) abzentrifugieren.

Pellet (= Gesamtmembran) in 500 μl Puffer B (1 ml Potter) suspendieren. 100 μl 20 % (w/v) Sarcosyl zugeben, Tubes mit Puffer B auffüllen und 1 h bei 43000 rpm (Kontron, TST 54 Rotor) zentrifugieren.

Überstand (= innere Membran) bei -80°C aufbewahren,

Pellet mit 1 % (w/v) Sarcosyl auffüllen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Mit dem Potter das Pellet suspendieren und 1 h bei 43000 rpm (Kontron, TST 54 Rotor) zentrifugieren.

Pellet (= äußere Membran) mit 200 μl Auftragspuffer ohne Bromphenolblau aufnehmen (im Potter suspendieren) und bei -80°C aufbewahren.

Bemerkung: Sarcosyl = N-Lauroyl Sarcosin

Nach dem Zellaufschluß wurde im Kühlraum gearbeitet. Für die Zentrifugation müssen die Tubes randvoll sein, es wird mit dem entsprechenden Puffer aufgefüllt.

Die Puffer zur Membranpräparation sind in II.4,5 aufgeführt.

11. Membranpräparation von ^{35}S -Methionin markierten Bakterien

Die Membranpräparation von ^{35}S -Methionin markierten Bakterien wurde bei Kontrollzellen, gehemmten Zellen d.h. 1 h nach der Zugabe von α -MG und bei adaptierten Bakterien vorgenommen.

Für die Kontrollbakterien wurden 500 ml MRE 600 (Nakada Medium, 1 g Glucose) angezüchtet; Wachstumskontrolle erfolgte bis $\text{OD}_{578} = 0,85$. Bei dieser optischen Dichte wurden 2 ml der Bakterien mit 6 μl (31 μCi) ^{35}S -Met in einem Einbauglas mit Rührfischen auf einem Magnetrührer im Brutraum inkubiert. Zur Einbaukontrolle wurden je 10 μl auf Papierfilter in eiskalte 10 % TCA nach 1, 2, 3 und 9 Minuten entnommen. (Die Filter wurden wie in II,6 behandelt). Nach 10 Minuten wurde der Rest in ein Dupont-Glas (für Sorvall-Zentrifuge) überführt. Von den 500 ml Bakterien wurden 3 x 20 ml in Corex-Gläsern 30 Minuten bei 8000 rpm (Sorvall, Kühlraum) zentrifugiert. Das Pellet wurde in wenig eiskalte NaCl Lösung aufgenommen und in das Dupont-Glas mit den markierten Bakterien überführt. Nochmals wurde 30 Minuten bei 8000 rpm (Sorvall, Kühlraum) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 0,9 % NaCl Lösung gewaschen, zentrifugiert und nun wurde das Pellet bei -80°C aufbewahrt.

Für die gehemmten Bakterien wurden 500 ml MRE 600 angezüchtet und das Wachstum bis $\text{OD}_{578} = 0,335$ kontrolliert. Jetzt wurden 28 ml α -MG-Lösung zugegeben und nach 1 h 13 min wurden 2 ml der Bakterien wie bei den Kontrollbakterien inkubiert. Da die optische Dichte jetzt nur 0,335 betrug, wurden

5 x 20 ml von den 500 ml Bakterien in Corex-Gläsern zentrifugiert und das Pellet mit den markierten Zellen im Dupont-Glas gemischt; dann wurden die Bakterien wie die Kontrollzellen behandelt.

Für die adaptierten Bakterien wurden zunächst 200 ml MRE 600-Zellen angezüchtet. Bei $OD_{578} = 0,3$ erfolgte die Zugabe von 11,2 ml α -MG-Lösung, dann wurde das Wachstum bis $OD_{578} = 0,675$ verfolgt. Jetzt wurden die restlichen 300 ml Nakada Medium und die restliche α -MG-Lösung (16,8 ml) zugegeben und das Wachstum bis $OD_{578} = 0,865$ kontrolliert. Bei dieser optischen Dichte wurden 2 ml der Bakterien wie die Kontrollbakterien inkubiert. Von den 500 ml Bakterien wurden wie bei den Kontrollbakterien 3 x 20 ml in Corex-Gläsern zentrifugiert und ansonsten wie die Kontrollbakterien behandelt. Die Bakterien wurden aufgetaut und bis zur Gesamtmembran wie in II.10 behandelt. Dann wurde wegen der geringen Mengen die Gesamtmembran in 150 μ l Puffer B aufgenommen, suspendiert und 25 μ l 20 % (w/v) Sarcosyl zugegeben. Zentrifugiert wurde jetzt in einer Beckman Airfuge Zentrifuge bei 26 psi (150000 g) 1 h bei 4°C . Die innere Membran wurde bei -80°C aufbewahrt; die äußere Membran wurde in 50 μ l Auftragspuffer aufgenommen und ebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

12. Gelelektrophorese

Die Proteine der inneren und äußeren Membran und des Cytosols wurden auf Polyacrylamidgelen (130 x 150 x 1,5 mm bzw. 170 x 270 x 1 mm bei radioaktiv markierten Proben) elektrophoretisch getrennt, die Herr Deuber nach Lugtenberg et al. (11)

mit Abänderungen (5) herstellte, wofür ich ihm hier recht herzlich danke.

Je 100 µg Protein der inneren Membran und des Cytosols und ca. 60 µg Protein der äußeren Membran wurden in Auftragspuffer (II.4.5.3) aufgenommen. (Der Proteingehalt wurde mit Biuret bzw. BIO.RAD bestimmt und bezog sich auf Rinderserumalbumin als Standard.) Die Proben wurden im Wasserbad bei 90 - 100°C 5 Minuten lang inkubiert und nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur auf das Gel aufgetragen.

Bei dem verwendeten Gelsystem setzte sich das Trenngel aus 7,66 % (w/v) Acrylamid (ausgehend von der Stammlösung I, II.4.6.1), 0,2 % (w/v) Natriumdodecylsulfat, 0,375M TRIS·HCl pH 8,8 und 0,2 % (v/v) Tetramethyläthylendiamin und das Sammelgel aus 2,3 % (w/v) Acrylamid (ausgehend von der Stammlösung II, II.4.6.2), 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat, 0,125M TRIS·HCl pH 6,8 und 0,2 % (v/v) Tetramethyläthylendiamin zusammen. Die Polymerisation wurde in beiden Fällen mit Ammoniumperoxidisulfat (Endkonzentration: 0,025 % (w/v)) gestartet.

Nach ca. 12 h wurde bei einer konstanten Stromstärke von 25mA/Gel der Lauf durchgeführt. Der Elektrodenpuffer bestand aus 0,025M TRIS·HCl pH 8,3; 0,19M Glycerin und 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat.

Nach einer Laufzeit von ca. 3 - 4 h, kurz bevor Bromphenolblau das Ende der Laufstrecke erreicht hatte, wurden die Gele fixiert und gefärbt.

Zum Färben ließ man die Färbegradstammlösung (II.4.6.3) 1:1 mit Äthanol verdünnt über ca. 12 h auf das Gel einwirken. Anschließend ließ man auf das Gel die Färbegradstammlösung 1:1 mit Wasser verdünnt einwirken, bis Proteinbanden sichtbar waren. Danach wurde das Gel mit 7,5 % Essigsäure entfärbt bis der Hintergrund vollständig klar war. Färben und Entfärben erfolgte unter ständigem leichtem Bewegen des Gels.

Vor dem Auftrocknen auf Aquarellpapier wurden die Gele für ca. 15 Minuten in 5 % Glycerinlösung gelegt.

Bei der Autoradiographie der radioaktiv markierten Proben wurden die Röntgenfilme etwa 1 Woche belichtet.

III Ergebnisse

1. Wirkung von α -Methylglucosid auf das Wachstum der Bakterien bei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

Bakterien transportieren α -Methylglucosid (α -MG) kompetitiv zur Glucose (17). Durch Zugabe von α -MG zum Kulturmedium wird wie Glucose auch α -MG in die Zelle transportiert. Da α -MG von den Bakterien nur phosphoryliert und nicht weiter metabolisiert werden kann (1), erzeugt es einen Energiemangel, der das Wachstum hemmt, wie in Abbildung 1 zu sehen ist. Diese Wachstumshemmung der Bakterien ließ sich mit steigenden α -MG Konzentrationen abstufen, wobei Endkonzentrationen von 36 mM bis 54 mM α -MG im Kulturmedium kaum merkliche Hemmung machten. Ab einer Konzentration von ca. 80 mM α -MG war das Wachstum der Bakterien für etwa eine Stunde gestoppt (Bakteriostase), ab 98 mM bis 116 mM α -MG für etwa zwei Stunden und bei größeren Konzentrationen entsprechend länger. Bei Konzentrationen, die größer als 200 mM waren, wuchsen die Bakterien über sechs Stunden nicht weiter. In diesen Fällen trat durch die relativ großen zugegebenen Volumina eine sehr starke Verdünnung ein, so daß die Wirkung nicht eindeutig auf das α -MG zurückzuführen war.

Dieses Ergebnis war unabhängig von der optischen Dichte, bei der das α -MG zugegeben wurde. Erfolgte die Zugabe von α -MG z.B. bei $E_{578} = 0,7$, so war die Wirkung die gleiche wie bei $E_{578} = 0,3$.

Daß der Transport von α -MG kompetitiv zur Glucose erfolgt, konnte man auch erkennen, wenn man die Glucosekonzentration im Kulturmedium erhöhte oder Glycerin statt Glucose als Kohlenstoffquelle benützte. In Abbildung 2 wurden 0,4 % statt 0,1 % Glucose verwendet, und die Bakterien waren in ihrem Wachstum deutlich weniger gehemmt; bei 100 mM α -MG war das Wachstum beispielsweise kaum beeinträchtigt. Bei Glycerin als Energiequelle (Abbildung 3) trat praktisch keine Wachstumshemmung ein.

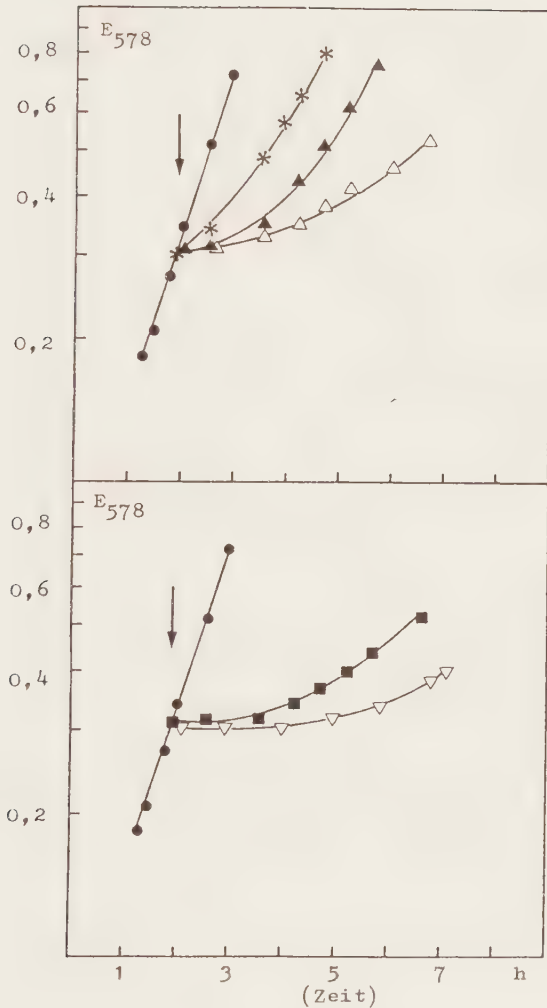


Abbildung 1 : Wachstumshemmung von MRE 600 mit steigenden α -Methylglucosid-Konzentrationen

Den Bakterien wurde bei $E_{578} = 0,3$ in steigenden Konzentrationen α -MG ins Kulturmedium gegeben; anschließend wurde das Wachstum in Abständen von 15 Minuten kontrolliert. (●) Kontrollkultur, der Wasser zugegeben wurde; (*) 64mM, (▲) 71mM, (△) 85mM, (■) 98mM, (▽) 142mM α -MG im Medium. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Zugabe an. Das Medium enthielt 0,1 % Glucose.

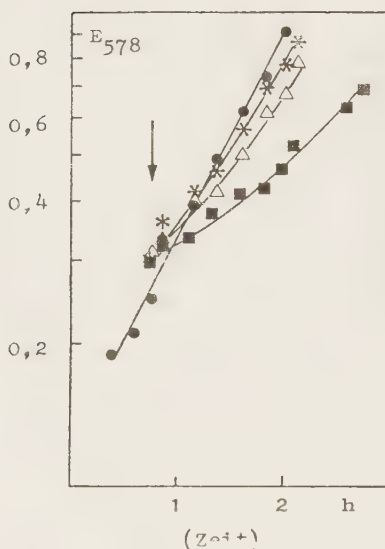


Abbildung 2 : Wachstumshemmung von MRE 600 mit steigenden α -Methylglucosid-Konzentrationen

Die Bakterien wurden in Nakada Medium mit 0,4 % Glucose gezüchtet. α -MG wurde bei $E_{578} = 0,3$ zugegeben; anschließend wurde das Wachstum in 15 Minuten Abständen gemessen. (●) Kontrollkultur, der Wasser zugegeben wurde; (×) 62mM, (Δ) 100mM und (■) 186mM α -MG im Medium. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Zugabe an.

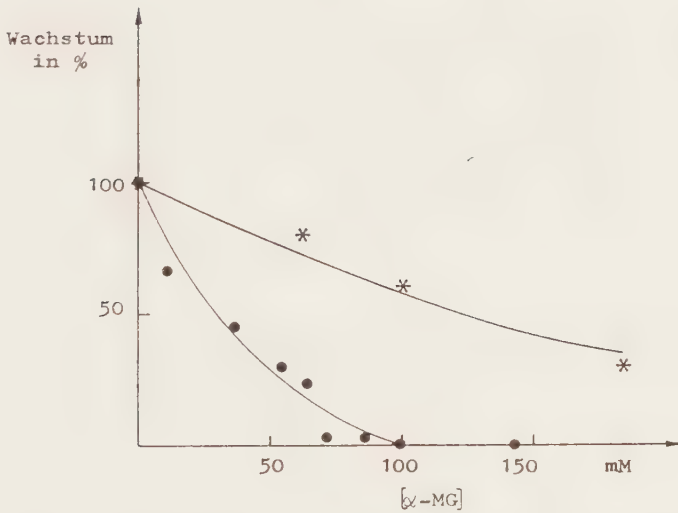


Abb. 2a : Wachstum von E.coli MRE 600 eine Stunde nach Gabe von α -MG in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration des Mediums

Die Bakterien wurden in Nakada Medium mit 1g (●) bzw. 4g (*) Glucose gezüchtet. Bei $E_{578} = 0,3$ wurde α -Methylglucosid zugegeben. Die beiden Kurven geben das Wachstum der Bakterien eine Stunde nach der Zugabe von α -MG in Prozent der Kontrolle wieder.

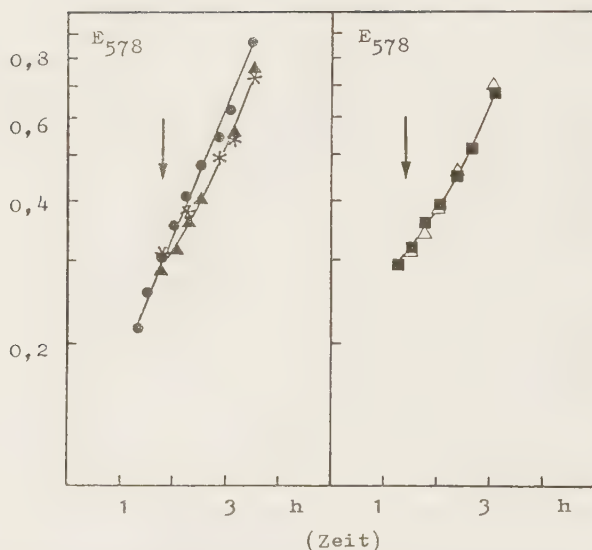


Abbildung 3 : Wachstumshemmung von MRE 600 mit steigenden α -Methylglucosid-Konzentrationen

Die Bakterien wurden in Nakada Medium ohne Glucose mit 0,2 % Glycerin gezüchtet. α -MG wurde bei $E_{578} = 0,3$ zugegeben; anschließend wurde das Wachstum in 15 Minuten Abständen kontrolliert. (●) Kontrollkultur, der Wasser zugegeben wurde; ($\ast$) 60mM, ($\blacktriangle$) 88mM, ($\blacksquare$) 116mM und ($\triangle$) 142mM α -MG im Medium. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Zugabe an.

Die RNA Synthese und die Proteinsynthese reagierten auf α -Methylglucosid wesentlich empfindlicher als das Wachstum. Bereits bei 36mM - einer Konzentration, die das Wachstum der Bakterien nicht wesentlich beeinflusste, trat eine deutliche Hemmung ein; dies zeigt die Abbildung 4a, b und die Abbildung 13a - d. Auch beim Stamm 341 reagierte die RNA Synthese empfindlicher auf α -MG als die Proteinsynthese - insgesamt war beim Stamm 341 die Hemmung schon bei geringeren α -MG Konzentrationen (18mM) deutlich (Abbildung 5a, b). Bei Glycerin als Energiequelle waren auch die RNA Synthese und die Proteinsynthese durch α -MG kaum zu beeinflussen, wie in Abbildung 6 zu sehen ist.

2. Reversibilität der Wirkung von α -Methylglucosid

Der kompetitive Transport von α -MG legt nahe, daß die Wirkung von α -MG reversibel ist. Sowohl die Zugabe von Glucose zu einer gehemmten Kultur, als auch frisches Medium für gehemmte Bakterien hob die Wirkung von α -MG sofort auf (Abbildung 7).

Die Wirkung von α -MG auf die RNA Synthese konnte durch Chloramphenicol (Paraxin) zum Teil wieder aufgehoben werden. Paraxin alleine wirkte über 30 Minuten nicht hemmend auf die RNA Synthese (Abbildung 8a). Die Aufhebung durch Paraxin war nicht total, sie hing von der eingesetzten α -MG Konzentration ab (Abbildung 8b, c).

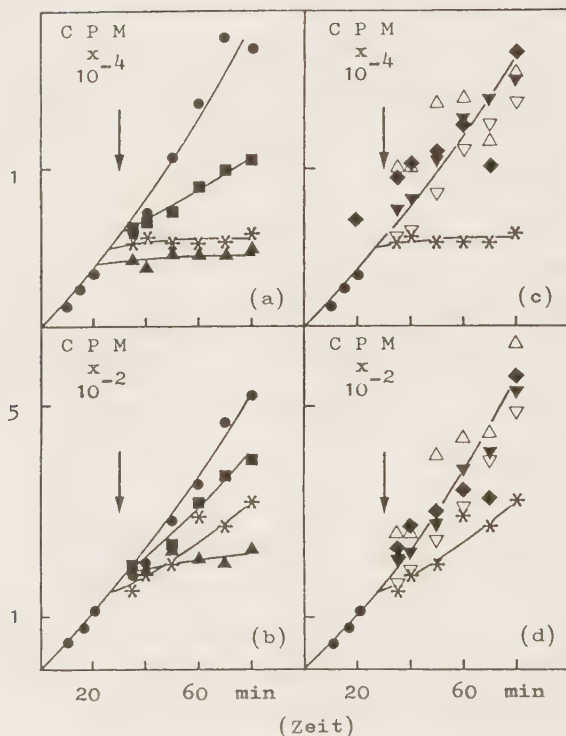


Abbildung 4 : Messung der RNA-Synthese (a), (c) und Messung der Proteinsynthese (b), (d) in E. coli MRE 600

Die Bakterien wurden mit ^3H -Uridin (50 mCi/mmol) und mit ^{14}C -Arginin (0,5 mCi/mmol) inkubiert. 30 Minuten nach dem Start wurde in steigenden Konzentrationen α -MG zugegeben. (●) Kontrollansatz, dem Wasser zugegeben wurde; (■) 36mM, (*) 70mM, (▲) 251mM und (▼), (▽), (△), (◆) je 70mM α -MG im Ansatz. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Zugabe an.

(c)+(d): Folgende Ansätze enthielten verschiedene Aminosäuregemische in einer Konzentration von 10^{-4}M .

(▼) AS, (▽) AS-Leu, (△) AS-Ala und (◆) AS-Phe

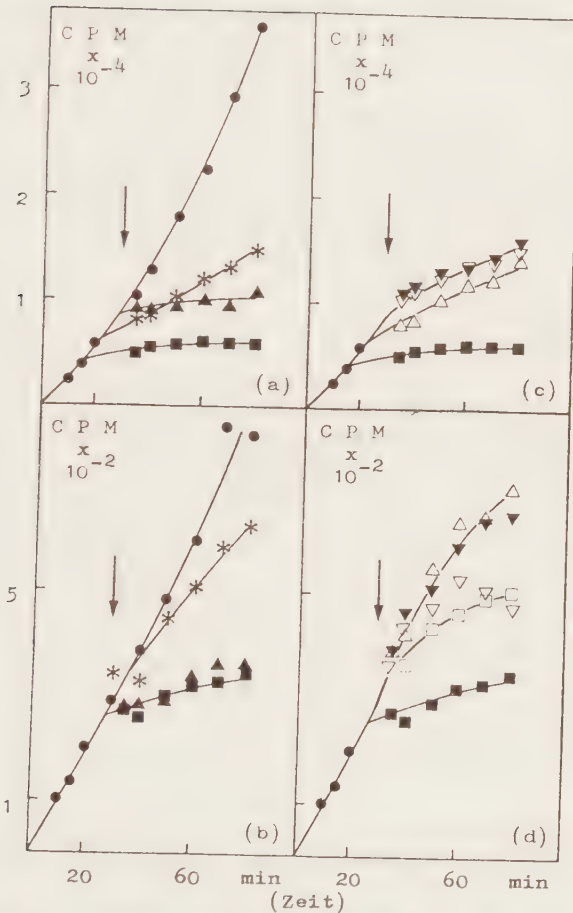


Abbildung 5 : Messung der RNA Synthese (a), (c) und Messung der Proteinsynthese (b), (d) beim Stamm PA1

Die Bakterien wurden mit ^3H -Uridin (50 mCi/mmol) und ^{14}C -Lysin (0,625 mCi/mmol) inkubiert. 30 Minuten nach dem Start wurde in steigenden Konzentrationen α -MG zugegeben. Der Pfeil gibt die Zugabe an. (●) Kontrollansatz, dem Wasser zugegeben wurde; (*) 18mM, (▲) 70mM, (■) 103mM und (Δ), (▼), (▽), (□) je 103mM α -MG im Ansatz.

(c)+(d): Folgende Ansätze enthielten Aminosäuregemische in einer Konzentration von 10^{-4}M .

(Δ) AS, (▼) AS-Ala, (▽) AS-Phe und (□) AS-Leu

(c) : Die Kurven (Δ) und (□) sind identisch.

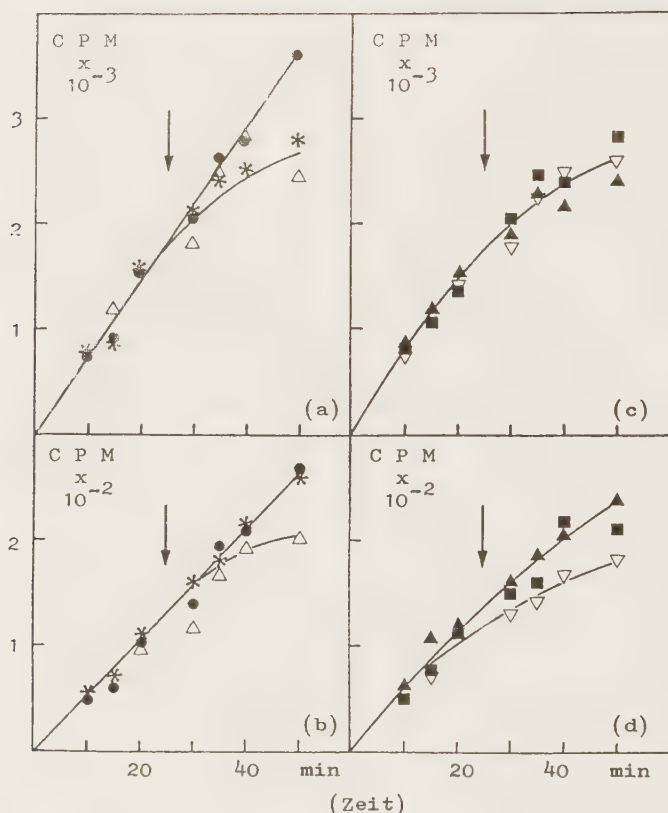


Abbildung 6 : Messung der RNA-Synthese (a), (c) und Messung der Protein-synthese (b), (d) in *E. coli* MRE 600

Die Bakterien wurden in Nakada Medium ohne Glucose mit 0,2 % Glycerin gezüchtet und mit ^3H -Uridin (50 mCi/mmol) und ^{14}C -Lysin (0,625 mCi/mmol) inkubiert. 25 Minuten nach dem Start wurde α -MG in steigenden Konzentrationen zugegeben. Der Pfeil gibt die Zugabe an. (●) Kontrollansatz, dem Wasser zugegeben wurde; (*) 70mM, (Δ) 103mM, (■) 135mM, (∇) 165mM und ($\blacktriangle$) 251mM α -MG im Ansatz.

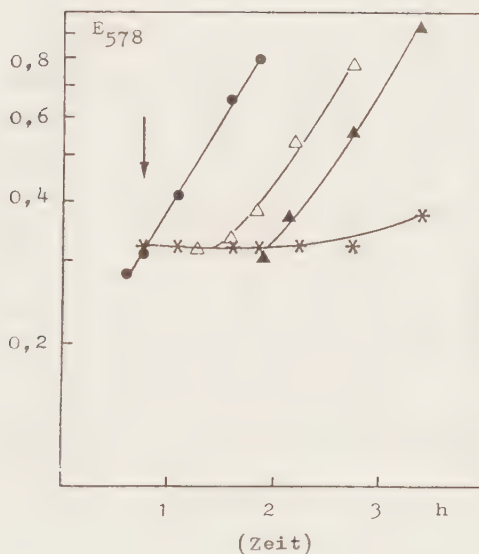


Abbildung 7 : Reversibilität der Wirkung von α -Methylglucoside auf *E. coli* MRE 600

Die Bakterien wurden in Nakada Medium gezüchtet. Bei $E_{578} = 0,3$ wurde 98mM α -MG zugegeben (Pfeil).

(●) Kontrollkultur, der Wasser zugegeben wurde; (*) Kultur, der α -MG zugegeben wurde; (△) Kultur, der 30 Minuten nach der α -MG Zugabe 140mM Glucose zugegeben wurde; (▲) Kultur, bei der die Bakterien 1 h nach der α -MG Zugabe filtriert, gut gespült und in frisches warmes Medium gegeben wurden.

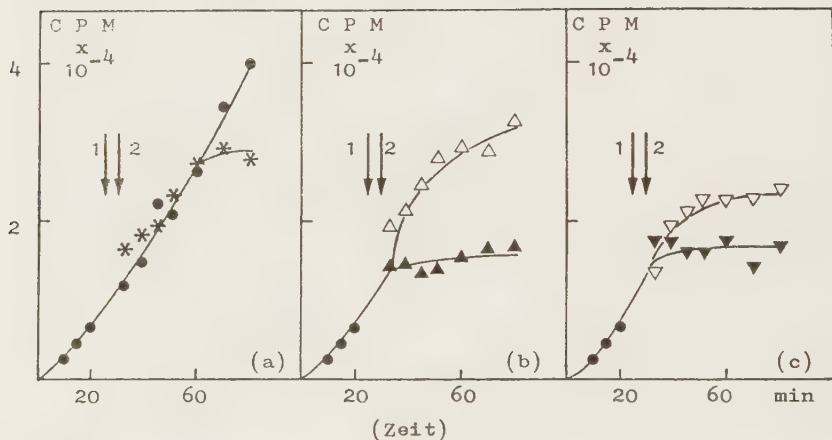


Abb. 8 : Wirkung von Paraxin (Chloramphenicol) auf die RNA-Synthesehemmung durch α -Methylglucoside in *E. coli* MRE 600

Die Bakterien wurden mit ^3H -Uridin (50 mCi/mmol) inkubiert. 25 Minuten nach dem Start wurde Paraxin (Pfeil 1) und 30 Minuten nach dem Start α -MG (Pfeil 2) zugegeben.

- (●) Kontrollansatz, dem Wasser zugegeben wurde;
- (*) Ansatz, dem 71,4 μ g/ml Paraxin zugegeben wurde;
- (▲) Ansatz, dem 36mM α -MG zugegeben wurde;
- (△) Ansatz, dem 71,4 μ g/ml Paraxin und 36mM α -MG zugegeben wurde;
- (▼) Ansatz, dem 103mM α -MG zugegeben wurde;
- (▽) Ansatz, dem 71,4 μ g/ml Paraxin und 103mM α -MG zugegeben wurde.

3. Aufhebung der Wirkung von α -Methylglucosid durch unterschiedliche Aminosäuregemische

Die Wachstums hemmung von α -MG auf die Bakterien konnte durch Zugabe von verschiedenen Aminosäuregemischen überwunden werden. Diese Aufhebung war von der Konzentration des eingesetzten Aminosäuregemisches abhängig, ließ sich aber durch Konzentrationen, die größer als $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ waren nicht mehr steigern, wie man in Abbildung 9 bis Abbildung 11 sehen kann. Es spielte keine Rolle, ob diese Aminosäuregemische vor oder nach der α -MG Zugabe zugefügt wurden (Vergleich von Abbildung 9 und 10). Es wurden ein Aminosäuregemisch, das alle 20 Aminosäuren enthielt, und alle Gemische, denen jeweils eine der 20 Aminosäuren fehlte (II.4.3), getestet. Es konnten keine Unterschiede in Bezug auf die Wirkung beobachtet werden. Abbildung 11 zeigt als Beispiel die Wirkung von AS, AS-Leu, AS-Phe und AS-Ala.

Auch die Hemmung der RNA Synthese und der Proteinsynthese durch α -MG konnte durch die verschiedenen Aminosäuregemische aufgehoben werden. Die Aufhebung der Hemmung wurde bei gleichbleibender Konzentration der Aminosäuregemische und steigender α -MG Konzentration schlechter (Abbildung 4c, d und 12e, f). Diese Aufhebung der Hemmung ließ sich auch beim Stamm PA1 beobachten (Abbildung 5c, d).

Einzelne Aminosäuren ($1,2 \cdot 10^{-3} \text{M}$) konnten die Hemmung durch α -MG nicht aufheben.

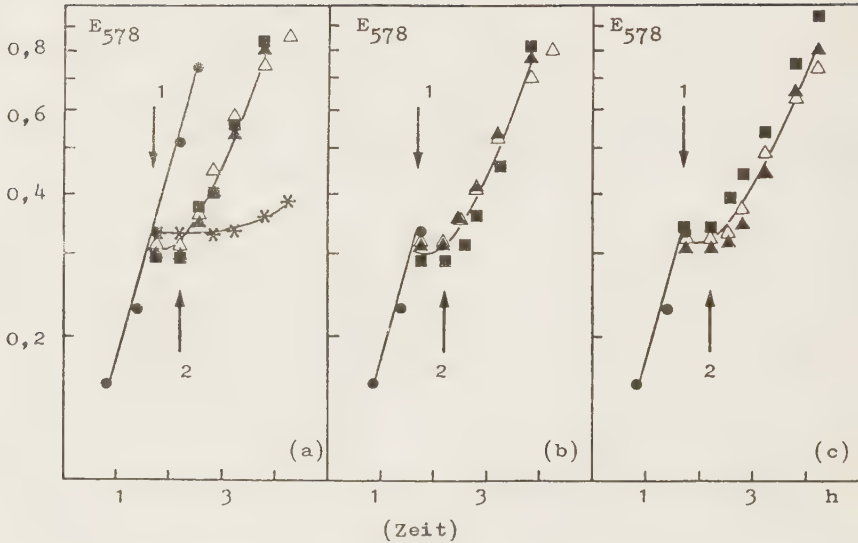


Abbildung 9 : Aufhebung der α -Methylglucosid Wirkung durch verschiedene Aminosäuregemische

Die Bakterien wurden in Nakada Medium gezüchtet und bei $E_{578} = 0,3$ wurde 98mM α -MG zugegeben (Pfeil 1). Eine halbe Stunde nach der α -MG Zugabe wurden Aminosäuregemische in der Konzentration (Δ) $4,7 \cdot 10^{-5}M$, ($\blacktriangle$) $9,3 \cdot 10^{-5}M$ und ($\blacksquare$) $1,3 \cdot 10^{-4}M$ zugegeben (Pfeil 2). (●) Kontrollbakterien, denen Wasser zugegeben wurde; (*) Bakterien, denen nur α -MG zugegeben wurde.

(a): Zugabe von AS; (b): Zugabe von AS-Leu und (c): Zugabe von AS-Phe (II.4.3).

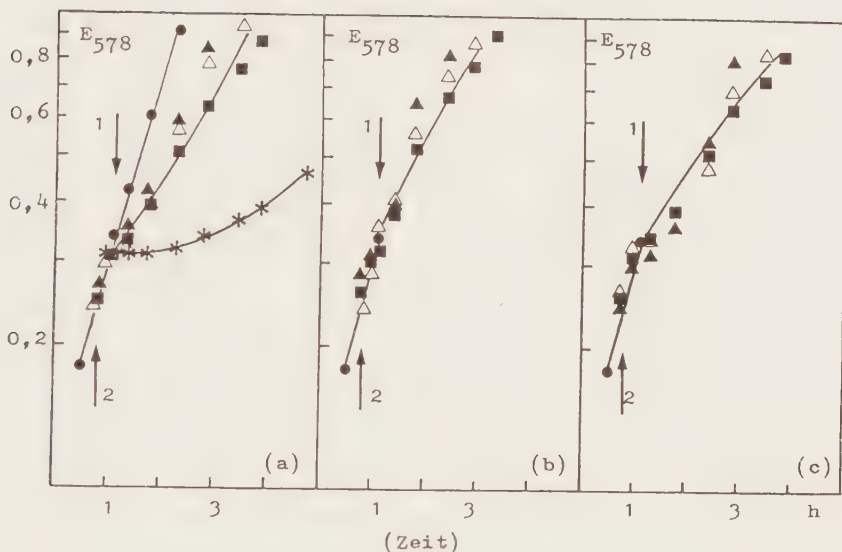


Abbildung 10 : Aufhebung der Wachstums hemmung von α -Methylglucosid durch verschieden konzentrierte Aminosäuregemische

Die Bakterien wurden in Nakada Medium gezüchtet. Bei $E_{578} = 0,25$ wurden Aminosäuregemische in den Konzentrationen (■) $4,7 \cdot 10^{-5} M$, (Δ) $9,3 \cdot 10^{-5} M$ und ($\blacktriangle$) $1,3 \cdot 10^{-4} M$ zugegeben (Pfeil 2).

Bei $E_{578} = 0,3$ wurde 98mM α -MG zugegeben (Pfeil 1).

(●) Kontrollbakterien, denen Wasser zugegeben wurde; (*) Bakterien, denen nur α -MG zugegeben wurde.

(a): Zugabe von AS; (b): Zugabe von AS-Leu; (c): Zugabe von AS-Phe (II.4.3).

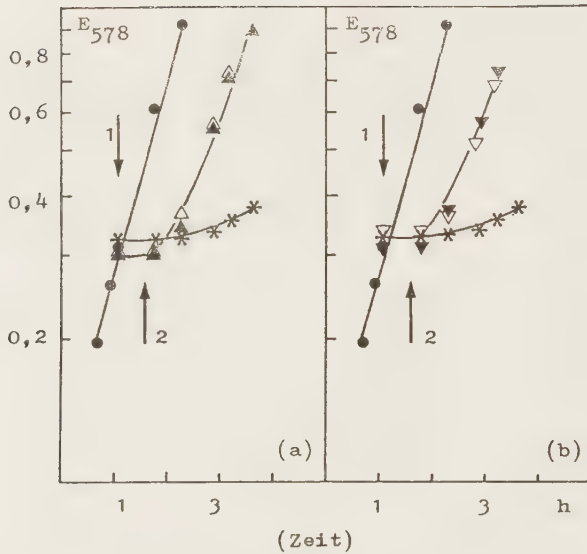


Abbildung 11 : Wirkung verschiedener Aminosäuregemische auf die Wachstumshemmung durch α -Methylglucosid

Die Bakterien wurden in Nakada Medium gezüchtet. Bei $E_{578} = 0,3$ wurde 98mM α -MG zugegeben (Pfeil 1). Eine halbe Stunde nach der α -MG Zugabe wurden verschiedene Aminosäuregemische in einer Konzentration von $1,8 \cdot 10^{-4}$ M zugegeben (Pfeil 2).

(●) Kontrollbakterien, denen Wasser zugegeben wurde; (*) Bakterien, denen nur α -MG zugegeben wurde; (Δ) Zugabe von AS; (▲) Zugabe von AS-Leu; (▽) Zugabe von AS-Ala; (▼) Zugabe von AS-Phe.

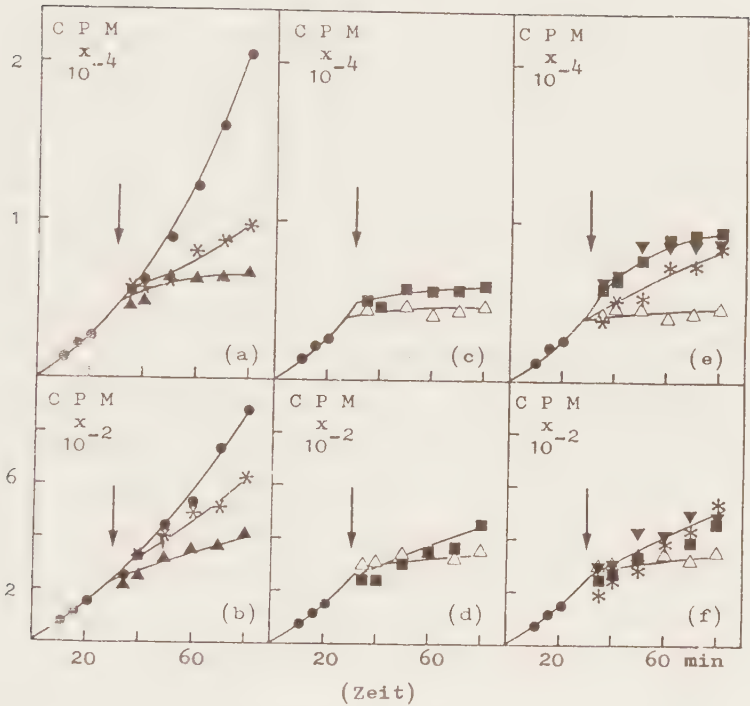


Abbildung 12 : Messung der RNA Synthese (a), (c), (e) und
Messung der Proteinsynthese (b), (d), (f)

Die Bakterien wurden mit ^3H -Uridin (50 mCi/mmol) und ^{14}C -Lysin (0,625 mCi/mmol) inkubiert. 30 Minuten nach dem Start wurde in steigenden Konzentrationen α -MG zugegeben (Pfeil).

(●) Kontrollansatz, dem Wasser zugegeben wurde.

(a), (b), (c), (d): (×) 36mM, (▲) 70mM, (■) 103mM und (Δ) 135mM α -MG im Ansatz.

(e), (f): (Δ), (×), (▼), (■) je 135mM α -MG im Ansatz.

Folgende Ansätze enthielten Aminosäuregemische in einer Konzentration von 0,1mM. (■) AS-Phe, (▼) AS-Ala und (×) AS-Leu.

4. Adaptation der Bakterien an α -Methylglucosid

Da die Bakterien nach der Zugabe von α -MG nach einer gewissen Zeit wieder langsam weiterwuchsen, sollte nun untersucht werden, ob sich die Bakterien an α -MG gewöhnen - ob es eine Adaptation an α -MG gibt. Den Bakterien wurde bei $OD_{578} = 0,3$ 98mM bis 105mM α -MG zugegeben. Nachdem die Bakterien bis ca. $OD_{578} = 0,85$ gewachsen waren, wurden sie filtriert und in frischem Medium auf $OD_{578} = 0,3$ verdünnt. Sofort wurde wieder 98mM bis 105mM α -MG zugegeben. Jetzt waren die Bakterien in ihrem Wachstum nicht mehr gehemmt, sie wuchsen trotz α -MG Zugabe weiter, d.h. sie waren an α -MG adaptiert (Abbildung 13). Es konnte gezeigt werden, daß (durch 98mM α -MG) adaptierte Bakterien nun Konzentrationen bis 137mM α -MG tolerierten. Bei der Wahl der α -MG Konzentration von 98mM bis 105mM für die Adaptation spielten zunächst rein praktische Überlegungen eine Rolle. Erstens durfte die Zeit zum Erhalt von adaptierten Bakterien für Folgeversuche nicht zu groß sein und zweitens sollte durch die α -MG Zugabe keine zu große Verdünnung entstehen. Diese Konzentrationen wurden dann für alle Versuche mit adaptierten Zellen verwendet.

Von Interesse war, ob die Adaptation der Bakterien an α -MG reversibel war oder ob sie "vererbt" wird. Dazu wurden adaptierte Zellen filtriert, in frischem Medium auf $OD_{578} = 0,3$ verdünnt und bis $OD_{578} = 0,85$ (zwei Generationszeiten) ohne α -MG gezüchtet. Nach erneuter Filtration wurde den Bakterien 105mM und 111mM α -MG zugegeben. Jetzt wuchsen die Bakterien

nicht mehr sofort weiter, sie waren gehemmt (Abbildung 14). Die Adaptation ist also reversibel. Die entstandene Wachstums-
hemmung entsprach aber nicht der von nichtadaptierten Bakte-
rien bei gleicher α -MG Konzentration, sondern entsprach
etwa einer Konzentration von 71-85mM bei nichtadaptierten
Bakterien (vgl. Abbildung 1). Eine gewisse restliche "Tole-
ranz" war noch vorhanden. Da nach zwei Generationszeiten
(90 Minuten) die Adaptation fast nicht mehr vorhanden war,
wurden die Zeitabschnitte, die man adaptierte Zellen ohne
 α -MG wachsen ließ, feiner abgestuft. In Abständen von 15,
30, 45, 60 und 75 Minuten nach der Filtration wurde den Bak-
terien α -MG zugegeben. Die Bakterien hatten jetzt zwar zum
Teil eine größere optische Dichte als 0,3, dies spielte kei-
ne Rolle, da die Wirkung von α -MG unabhängig von der opti-
schen Dichte war.

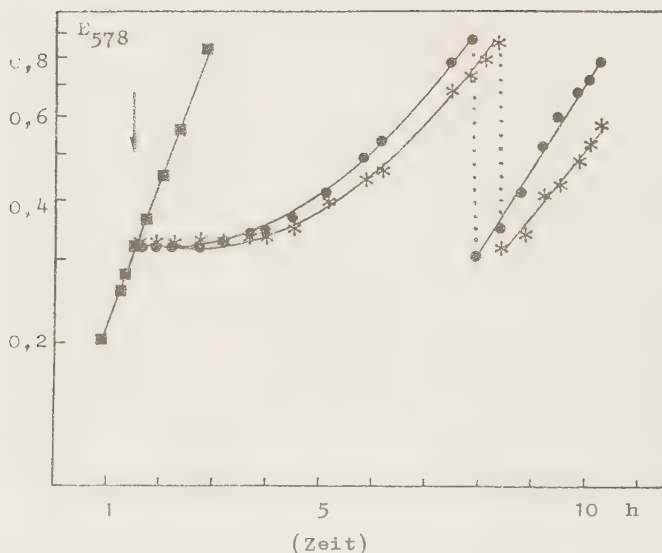


Abbildung 13 : Adaptation an α -Methylglucosid

Die Bakterien wurden in Nakada Medium gezüchtet. Bei $E_{578} = 0,3$ wurde α -MG zugegeben (Pfeil); anschließend wurde das Wachstum bis $E_{578} = 0,85$ beobachtet. Nun wurden die Bakterien filtriert (....), es wurde gut nachgespült, und in frischem warmem Medium auf eine optische Dichte von $E_{578} = 0,3$ verdünnt. Diesen Bakterien wurde sofort wieder die gleiche Menge α -MG zugegeben wie vorher.

($\blacksquare$) Kontrollbakterien, denen Wasser zugegeben wurde; ($\bullet$) Bakterien, denen 98mM α -MG zugegeben wurde; ($*$) Bakterien, denen 105mM α -MG zugegeben wurde.

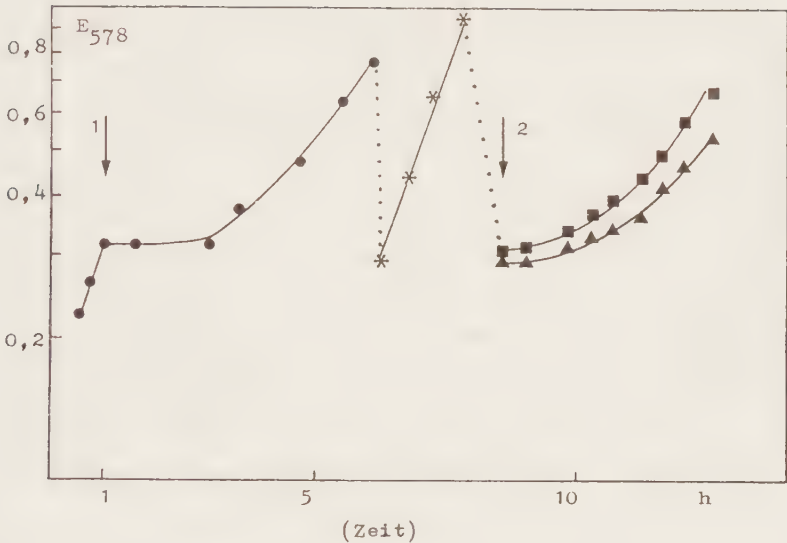


Abbildung 14 : Adaptationsverlust

Die Bakterien wurden in Nakada Medium gezüchtet. Bei $E_{578} = 0,3$ wurde 98mM α -MG zugegeben (Pfeil 1). Bei $E_{578} = 0,8$ wurden die Bakterien filtriert (...), gespült und in frischem warmem Medium auf $E_{578} = 0,3$ verdünnt. Nun wurde das Wachstum ohne α -MG bis $E_{578} = 0,9$ verfolgt, die Bakterien wieder filtriert (...) und auf $E_{578} = 0,3$ verdünnt. Jetzt wurde den Bakterien sofort α -MG zugegeben (Pfeil 2).

(●) Bakterien, denen 98mM α -MG zugegeben wurde;

(*) Bakterien, denen kein α -MG zugegeben wurde;

(■) Bakterien, denen 105mM α -MG zugegeben wurde; (▲) Bakterien, denen 111mM α -MG zugegeben wurde.

Dabei zeigte sich, daß bereits nach 30 Minuten wieder eine minimale Wachstumshemmung durch α -MG eintrat. Die Hemmung entsprach (bei der Konzentration 98mM) nicht mehr der von nichtadaptierten Bakterien (Abbildung 15). Das Toleranz- bzw. Adaptationsphänomen verdünnt sich also gewissermaßen mit der Vermehrung der Zellen.

Als nächstes tauchte die Frage auf, ob es für die Adaptation an α -MG nötig ist, daß das Wachstum der Bakterien über zwei Stunden steht (also eine Konzentration von 98-105mM), oder ob allein die Anwesenheit von α -MG im Medium - ohne Wachstumshemmung - zum Erreichen der Adaptation genügt. Um diese Frage zu beantworten, wurden zwei Experimente durchgeführt. Einmal wurde den Bakterien bei $OD_{578} = 0,3$ nur 11mM α -MG zugegeben (eine subinhibitorische Konzentration), wodurch das Wachstum praktisch nicht beeinflußt wurde. Nach der Filtration wurde dann 101mM α -MG zugegeben, die Bakterien wuchsen sofort weiter, waren also adaptiert (Abbildung 16a).

Dann wurde nichtadaptierten Bakterien bei $OD_{578} = 0,25$ zunächst ein Aminosäuregemisch (AS) in einer Konzentration von $1,4 \cdot 10^{-4}M$ zugegeben und bei $OD_{578} = 0,3$ 101mM α -MG. Die Bakterien waren in ihrem Wachstum nicht gehemmt. Nach der Filtration wurde sofort wieder 101mM α -MG zugegeben, und auch dieses Mal waren die Bakterien adaptiert (Abbildung 16b). Beide Versuche zeigen, daß für die Adaptation an α -MG eine Bakterio- stase von etwa zwei Stunden nicht erforderlich ist und daß subinhibitorische Konzentrationen von α -MG im Medium (11mM) genügen, um die Zellen an α -MG zu adaptieren.

Zum Abschluß wurde untersucht, wie weit man die α -MG Konzentration bei adaptierten Bakterien steigern kann. Den adaptierten Zellen wurde jeweils nach erneuter Filtration eine gesteigerte α -MG Konzentration zugegeben. Dabei zeigte sich, daß die adaptierten Bakterien die Zugabe von zunächst 121mM und dann 198mM α -MG nicht wesentlich hemmte. Nach weiterer Filtration wurde das Wachstum mit 241mM α -MG etwas verlangsamt, und danach war mit 308mM α -MG der Endpunkt erreicht, die Bakterien wuchsen nicht mehr weiter (Abbildung 17). Dabei muß berücksichtigt werden, daß 308mM α -MG einer Zugabe von 1ml α -MG-Lösung auf 5ml Ansatzvolumen entsprechen, also eine sehr starke Verdünnung eingetreten war (die Lyse der Bakterien spricht für einen zusätzlichen osmotischen Effekt).

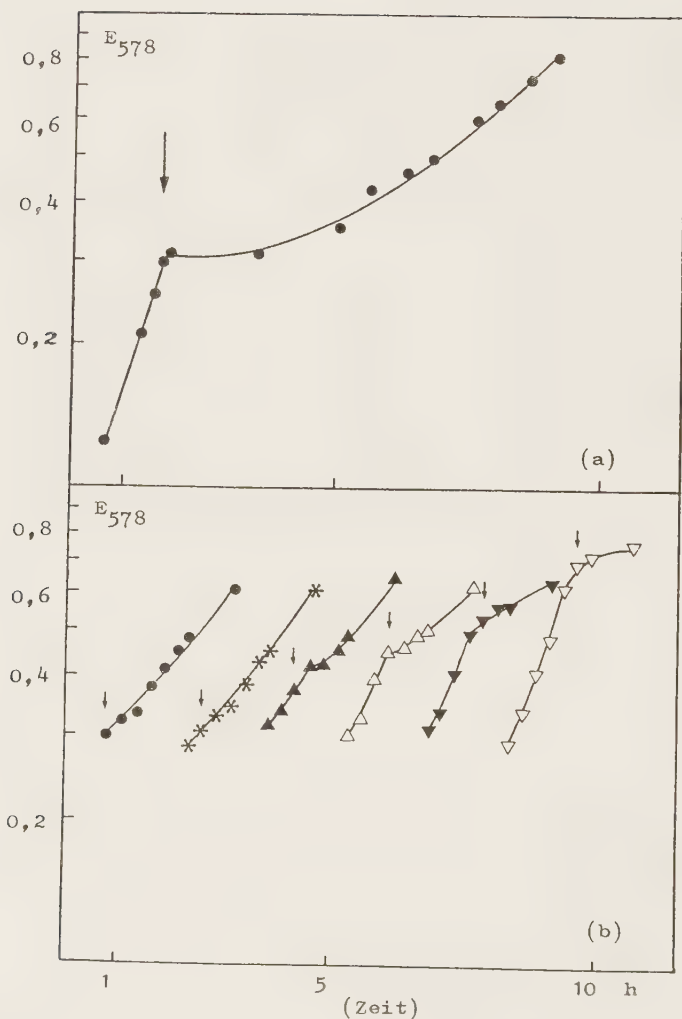


Abbildung 15 : Dauer der Adaptationseigenschaft

- (a) Die Bakterien wurden in Nakada Medium gezüchtet, bei $E_{578} = 0,3$ wurden 98mM α -MG (●) zugegeben (Pfeil). Bei $E_{578} = 0,85$ wurden die Bakterien filtriert und in frischem Medium auf $E_{578} = 0,3$ verdünnt.
- (b) Jetzt wurde den Bakterien 98mM α -MG zugegeben (Pfeil), und zwar (●) sofort, (*) nach 15 Minuten, (▲) nach 30 Minuten, (△) nach 45 Minuten, (▼) nach 60 Minuten und (▽) nach 75 Minuten.

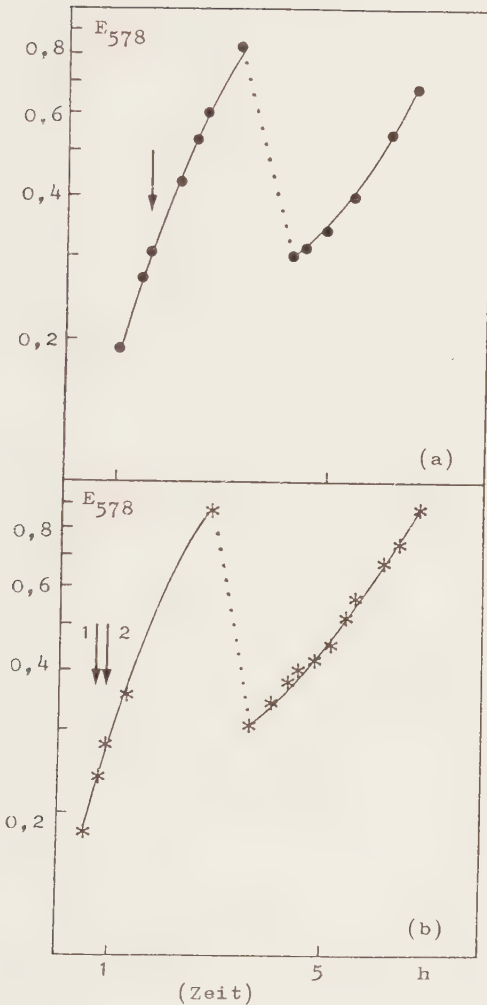


Abbildung 16 : Notwendigkeit der Wachstumshehmung für die
Adaptation an α -Methylglucosid

Die Bakterien wurden in Nakada Medium gezüchtet. Bei $E_{578} = 0,25$ wurde den Bakterien AS in einer Konzentration von 0,14mM zugegeben (b, Pfeil 1). Bei $E_{578} = 0,3$ wurde den Bakterien (a): 11mM (●) α -MG (Pfeil) bzw. (b): 101mM (*) α -MG (Pfeil 2) zugegeben. Bei $E_{578} = 0,85$ wurden die Bakterien filtriert (...), auf $E_{578} = 0,3$ verdünnt und sofort 101mM α -MG zugegeben.

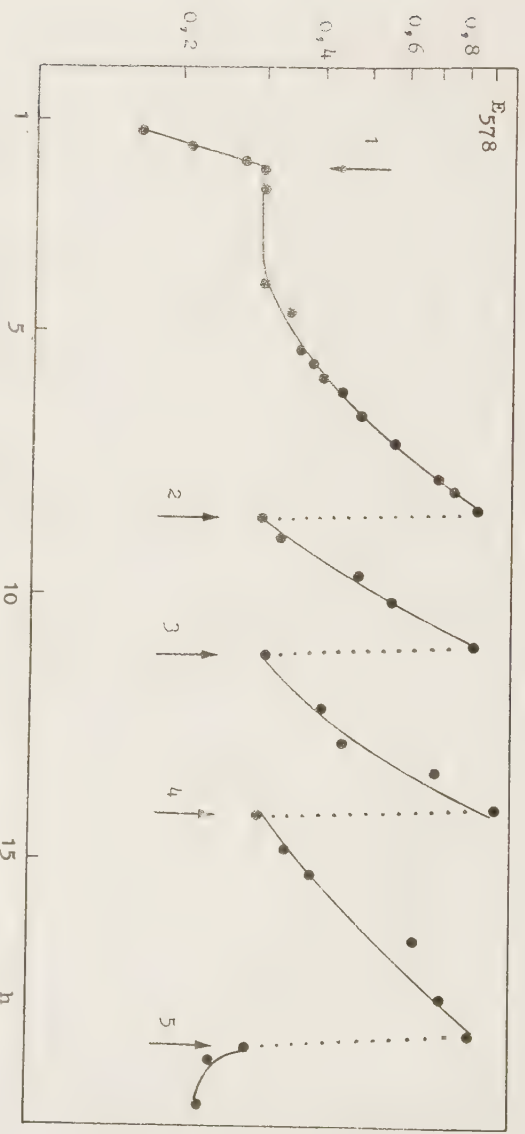


Abbildung 17 : Adaptation an steigende α -Methylglucosid Konzentrationen

Die Bakterien wurden in Nakada Medium gezüchtet. Bei $E_{578} = 0,3$ wurde 101mM α -MG zugegeben (Pfeil 1). Bei $E_{578} = 0,85$ wurden die Bakterien filtriert, in frisches Medium gegeben auf $E_{578} = 0,3$ verdünnt (dies geschah nach jeder Filtration) und sofort 121mM α -MG zugegeben (Pfeil 2). Bei $E_{578} = 0,85$ wurden die Bakterien wieder filtriert, in Medium gegeben und sofort 168mM α -MG zugegeben (Pfeil 3). Nach Erreichen von $E_{578} = 0,9$ wurde erneut filtriert und in frischem Medium sofort 241mM α -MG zugegeben (Pfeil 4). Noch einmal wurde bei $E_{578} = 0,85$ filtriert und in frisches Medium 308mM α -MG zugegeben (Pfeil 5).

5. Kinetische Charakterisierung des Glucosetransports bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien

Nachdem nun bekannt war, daß die Bakterien an α -MG adaptieren, ergab sich die Frage, auf welchem Mechanismus die Adaptation beruht. Da α -MG kompetitiv zur Glucose transportiert wird, sollte zunächst untersucht werden, ob sich im Transportsystem bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien Unterschiede ergeben. Dazu wurde der K_m des Glucosetransports bei Kontrollzellen und bei adaptierten Zellen bestimmt. Zur Bestimmung des K_m von Glucose bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien wurden Aufnahmekinetiken von ^{14}C -Glucose gemessen. Der K_m von Glucose beträgt nach der Literatur (7) ca. $10\ \mu\text{M}$. Es wurden Konzentrationen von $1,4\text{--}34\ \mu\text{M}$, die um diesen K_m lagen, und im Verhältnis dazu sehr kleine Konzentrationen von $70\text{--}340\text{ nM}$ Glucose eingesetzt. *)

Es zeigte sich, daß bei den kleinen Konzentrationen die Glucoseaufnahme bei den adaptierten Zellen deutlich größer war, als bei den Kontrollzellen (Abbildung 18). Für die Aufnahmegeschwindigkeit zeigte sich, daß sie bei den adaptierten Bakterien annähernd doppelt so groß war, wie bei den Kontrollbakterien.

Beim Auftragen nach Lineweaver-Burk (Abbildung 19) ließ sich dann der K_m bestimmen. Für die eingesetzten Konzentrationen von $70\text{--}340\text{ nM}$ wurden bei 3 unabhängigen Versuchen mit verschiedenen Anzüchtungen der Zellen folgende Werte gefunden (Tabelle 1):

*) Anmerkung: Wegen der möglichen Existenz mehrerer Transportsysteme unterschiedlicher Affinität, wurden zwei Konzentrationsbereiche gewählt.

Tabelle 1: K_m und v_{max} des Glucosetransports bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien

Kontrollbakterien		adaptierte Bakterien	
K_m ($\times 10^{-7}$) M	v_{max} (pmol/min·OD)	K_m ($\times 10^{-7}$) M	v_{max} (pmol/min·OD)
7,7	250	7,7	667
10,0	333	10,0	667
9,1	250	9,1	500

Bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien wurde in 3 unabhängigen Versuchen der K_m und v_{max} des Glucosetransports bestimmt. Dabei wurden Glucosekonzentrationen von 70-340nM eingesetzt.

Die Kontrollbakterien und die adaptierten Bakterien zeigten nur einen Unterschied in v_{max} , für den K_m wurden die gleichen Werte gefunden.

Bei höheren Konzentrationen jedoch (1,4-34 μ M) trat dieser Unterschied nicht mehr auf. Die Glucoseaufnahme war bei den adaptierten Bakterien im Verhältnis zu den Kontrollbakterien sogar etwas vermindert (Abbildung 20). Auch die Aufnahmegeschwindigkeit war jetzt bei den adaptierten Bakterien kleiner als bei den Kontrollbakterien (Abbildung 21).

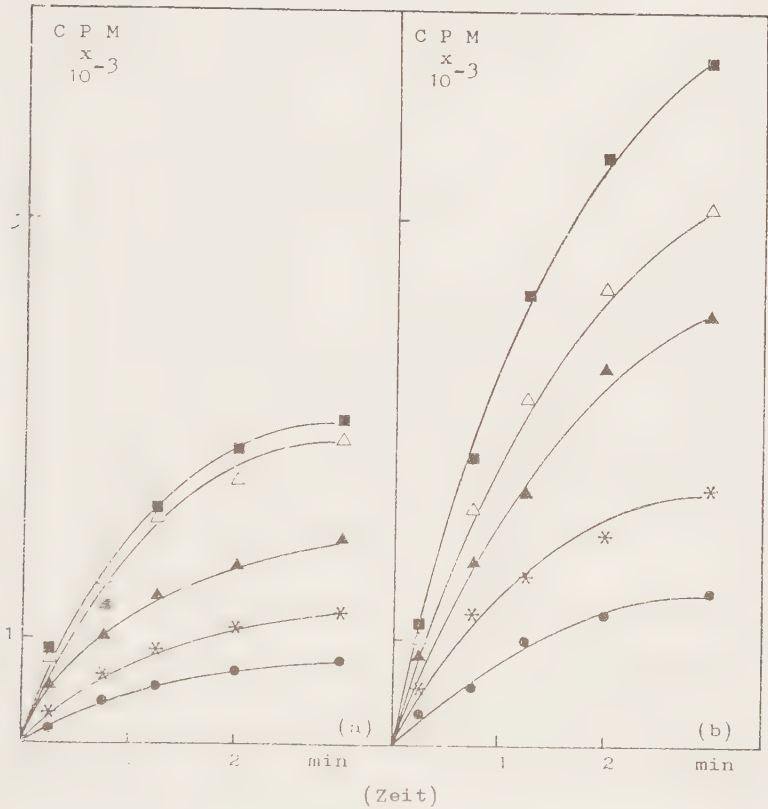


Abbildung 18 : Aufnahmekinetik von ^{14}C -Glucose

Bei Kontrollbakterien (a) und bei adaptierten Bakterien (b) wurde die ^{14}C -Glucoseaufnahme bei $E_{578} = 0,6$ gemessen. Dabei wurden Glucosekonzentrationen von ($\bullet$) 70nM, ($*$) 140nM, ($\blacktriangle$) 210nM, ($\triangle$) 270nM und ($\blacksquare$) 340nM eingesetzt.

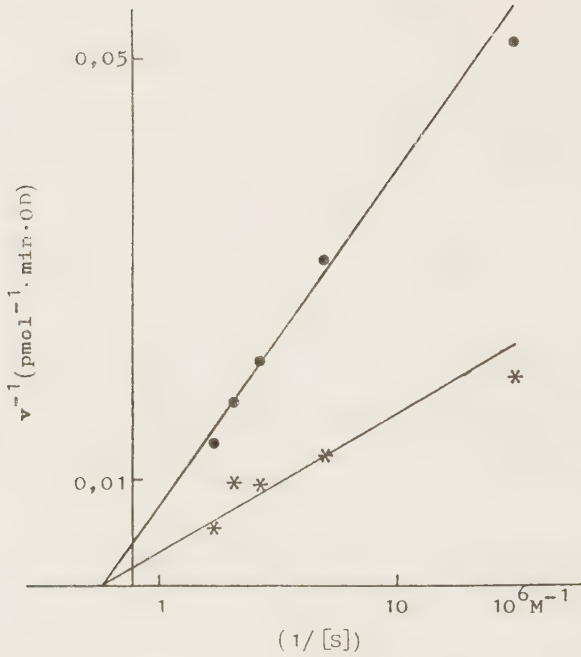


Abbildung 19 : Bestimmung des K_m von Glucose

Für Glucosekonzentrationen von 70-340nM wurde $1/[S]$ gegen $1/v$ aufgetragen. Dabei fand man für die Kontrollbakterien (●) den $K_m = 9,1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ und $v_{\max} = 250 \text{ pmol/min} \cdot \text{OD}$ und für die adaptierten Bakterien (*) den $K_m = 9,1 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ und $v_{\max} = 500 \text{ pmol/min} \cdot \text{OD}$.

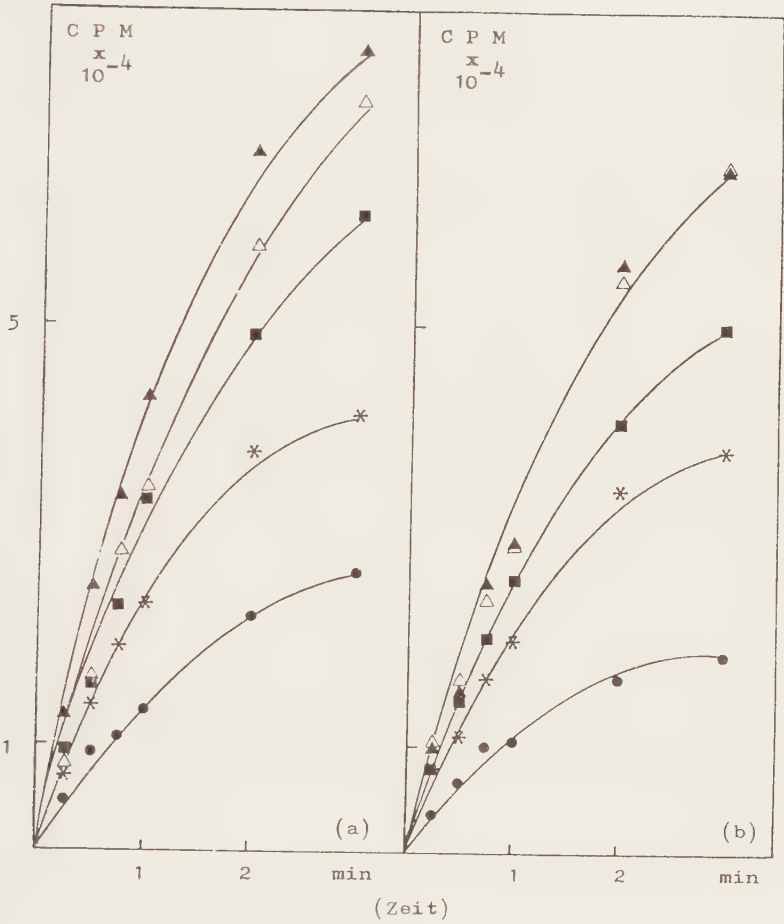


Abbildung 20 : ^{14}C -Glucose Aufnahmekinetik

Bei Kontrollbakterien (a) und bei adaptierten Bakterien (b) wurde die Glucoseaufnahme gemessen, Folgende Glucosekonzentrationen wurden eingesetzt: ($\bullet$) 1,4 μM , ($*$) 2,6 μM , ($\blacksquare$) 3,2 μM , ($\triangle$) 3,9 μM und ($\blacktriangle$) 4,6 μM .

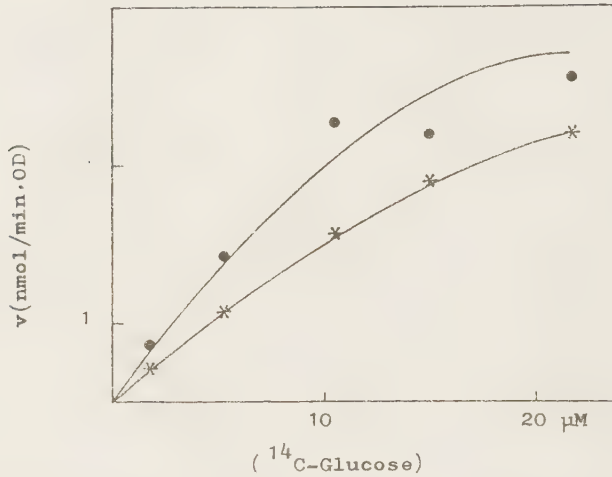


Abbildung 21 : Aufnahmegeschwindigkeit für Glucose

Für verschiedene Glucosekonzentrationen wurden die Aufnahmegeschwindigkeiten bei Kontrollbakterien (●) und bei adaptierten Bakterien (*) bestimmt.

Beim Auftragen von $1/[S]$ gegen $1/v$ (Abbildung 22) fand man nun folgende Werte für K_m und $v_{\max}$ (Tabelle 2):

Tabelle 2: K_m und $v_{\max}$ des Glucosetransports bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien

Kontrollbakterien		adaptierte Bakterien	
K_m (μM)	$v_{\max}$ (nmol/min·OD)	K_m (μM)	$v_{\max}$ (nmol/min·OD)
25	10	40	10
10	6,7	20	6,7
16,7	10	25	10

Bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien wurde in 3 unabhängigen Versuchen der K_m und $v_{\max}$ des Glucosetransports bestimmt. Dabei wurden Glucosekonzentrationen von 1,4-34 μM eingesetzt.

Für diese Konzentrationen fand man für die Kontrollbakterien einen K_m , der in der Größenordnung des Literaturwertes liegt. Für die adaptierten Bakterien fand man jetzt einen leicht größeren K_m . Für $v_{\max}$ waren die Werte für Kontrollbakterien und adaptierte Bakterien gleich.

6. Änderung des K_m von Glucose bei Hemmung der ^{14}C -Glucoseaufnahme mit α -Methylglucosid

Nun sollte die Frage geklärt werden, wie die Aufnahme von ^{14}C -Glucose durch α -MG bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien beeinflusst wird. Da die Hemmung der ^{14}C -Glucose-Aufnahme durch gleiche α -MG-Konzentrationen bei adaptierten Zellen sehr viel schwächer war, wurden für die

adaptierten Zellen größere Konzentrationen eingesetzt als für die Kontrollzellen (Abbildung 23 und Abbildung 24). Trotzdem war die Änderung des K_m des Glucosetransports bei der Hemmung der ^{14}C -Glucose-Aufnahme mit α -MG sehr schwer zu beurteilen. Es zeigte sich bei den kleinen ($70\text{-}340\text{nM}$) und bei den großen ($1,4\text{-}34\text{ }\mu\text{M}$) Glucosekonzentrationen, daß die Glucoseaufnahme durch $2,5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ und $6,8 \cdot 10^{-4}\text{M}$ α -MG bei den Kontrollzellen deutlich gehemmt und mit $1,1\text{mM}$ und $9,6\text{mM}$ bzw. 11mM α -MG bei den adaptierten Zellen deutlich geringer gehemmt war. Die Aufnahmegeschwindigkeiten nahmen in allen Fällen ab. Beim Auftragen nach Lineweaver-Burk ergaben sich für die Glucosekonzentrationen $70\text{-}340\text{nM}$ folgende Werte für den K_m und $v_{\max}$ (Tabelle 3):

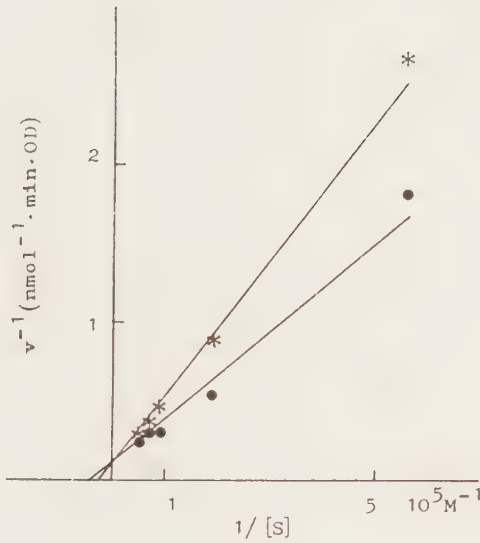


Abbildung 22 : Bestimmung des K_m von Glucose

Für Glucosekonzentrationen von 1,8-21,8 μM wurde $1/[S]$ gegen $1/v$ aufgetragen. Dabei fand man für Kontrollbakterien (●) den $K_m = 25 \mu\text{M}$ und $v_{\max} = 10 \text{ nmol/min} \cdot \text{OD}$ und für die adaptierten Bakterien (*) den $K_m = 40 \mu\text{M}$ und $v_{\max} = 10 \text{ nmol/min} \cdot \text{OD}$.

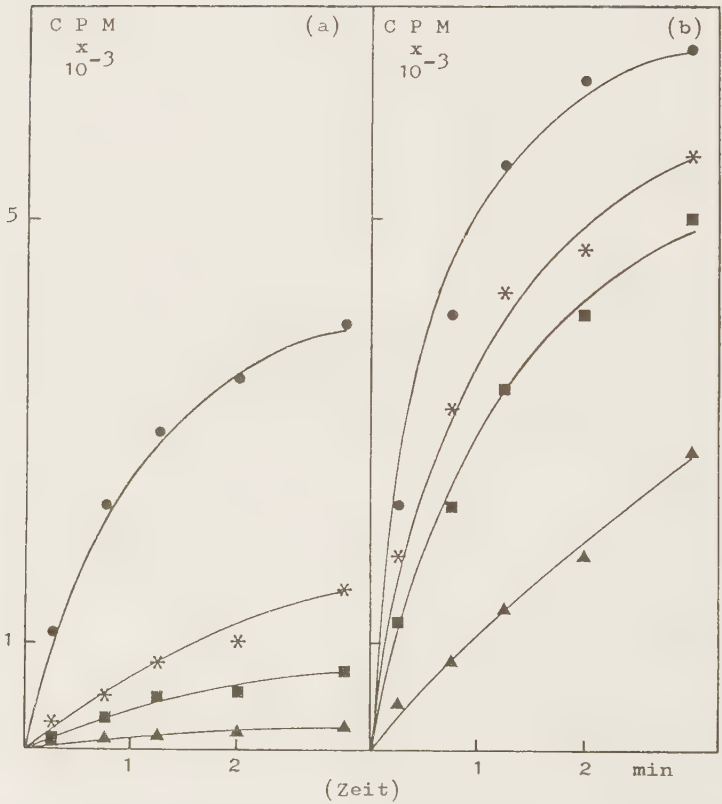


Abbildung 23 : Hemmung der ^{14}C -Glucoseaufnahme durch α -Methylglucosid

Bei Kontrollbakterien (a) und bei adaptierten Bakterien (b) wurde die Hemmung der ^{14}C -Glucoseaufnahme durch α -Methylglucosid bei $E_{578} = 0,6$ gemessen; es wurden 210nM Glucose eingesetzt.

(●) Kontrollansatz, ohne α -MG; (*) 0,28mM α -MG, (■) 0,96mM α -MG und (▲) 4,8mM α -MG im Ansatz.

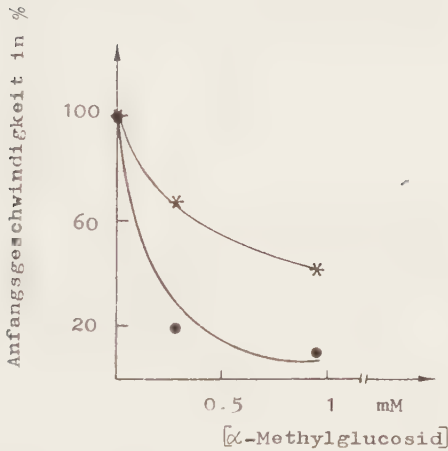


Abbildung 24 : Hemmung der ^{14}C -Glucoseaufnahme durch α -Methylglucosid

Bei der Hemmung der ^{14}C -Glucoseaufnahme wurde für Kontrollbakterien (●) und für adaptierte Bakterien (*) die Anfangsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der α -MG-Konzentration bestimmt und in Prozent der Anfangsgeschwindigkeit des Kontrollansatzes (ohne α -MG) berechnet.

Tabelle 3: Änderung von $v_{\max}$ des Glucosetransports bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien durch α -Methylglucosid

α -MG (mM)	Kontrollbakterien		adaptierte Bakterien	
	$K_m (\times 10^{-7}) M$	$v_{\max} (\text{pmol}/\text{min} \cdot \text{OD})$	$K_m (\times 10^{-7}) M$	$v_{\max} (\text{pmol}/\text{min} \cdot \text{OD})$
$\emptyset$	9,1	250	9,1	500
0,25	9,1	36	$\emptyset$	$\emptyset$
0,68	9,1	27	$\emptyset$	$\emptyset$
1,1	$\emptyset$	$\emptyset$	9,1	250
9,6	$\emptyset$	$\emptyset$	9,1	143

Bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien wurde die Glucoseaufnahme durch α -Methylglucosid gehemmt. Dabei wurden Glucosekonzentrationen von 70-340nM eingesetzt.

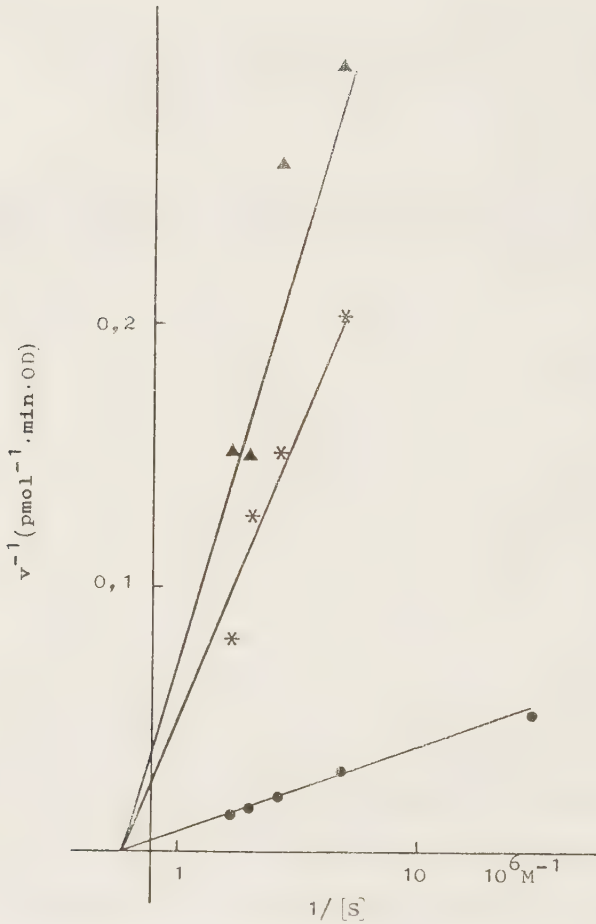
Man erhielt für die Kontrollzellen und für die adaptierten Zellen keine Änderung des K_m aber eine deutliche Verringerung von $v_{\max}$. Bei den adaptierten Bakterien nahm trotz größerer α -MG-Konzentration $v_{\max}$ deutlich weniger ab als bei den Kontrollbakterien (Abbildung 25 und 26). Für die Glucosekonzentrationen 1,4-34 μ M ergaben sich folgende Werte (Tabelle 4):

Tabelle 4: Änderung des K_m des Glucosetransports bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien durch α -Methylglucosid.

α -MG (mM)	Kontrollbakterien		adaptierte Bakterien	
	K_m (μ M)	$v_{\max}$ (nmol/min·OD)	K_m (μ M)	$v_{\max}$ (nmol/min·OD)
$\emptyset$	10	6,7	20	6,7
0,25	67	6,7	$\emptyset$	$\emptyset$
0,68	200	6,7	$\emptyset$	$\emptyset$
1,1	$\emptyset$	$\emptyset$	50	6,7
11	$\emptyset$	$\emptyset$	200	6,7
$\emptyset$	16,7	10	25	10
0,25	125	10	$\emptyset$	$\emptyset$
0,68	500	10	$\emptyset$	$\emptyset$
1,1	$\emptyset$	$\emptyset$	100	10
11	$\emptyset$	$\emptyset$	200	10

Bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien wurde die Glucoseaufnahme durch α -Methylglucosid gehemmt. Dabei wurden Glucosekonzentrationen von 1,4-34 μ M eingesetzt.

Für diese Konzentrationen ergab sich also eine deutliche Vergrößerung des K_m von Glucose für Kontrollbakterien und für adaptierte Bakterien, jedoch keine Änderung von $v_{\max}$ (Abbildung 27).



Abbildungung 25 : Änderung des K_m von Glucose mit α -Methylglucosid bei Kontrollbakterien

Für Glucosekonzentrationen von 70-340nM wurde der K_m von Kontrollbakterien bestimmt.

(●) Kontrollansatz, (*) Ansatz mit 0,25mM α -MG und (▲) Ansatz mit 0,68mM α -MG. Dabei fand man durch die α -MG Zugabe keine Änderung des K_m , jedoch eine Änderung von $v_{\max}$.

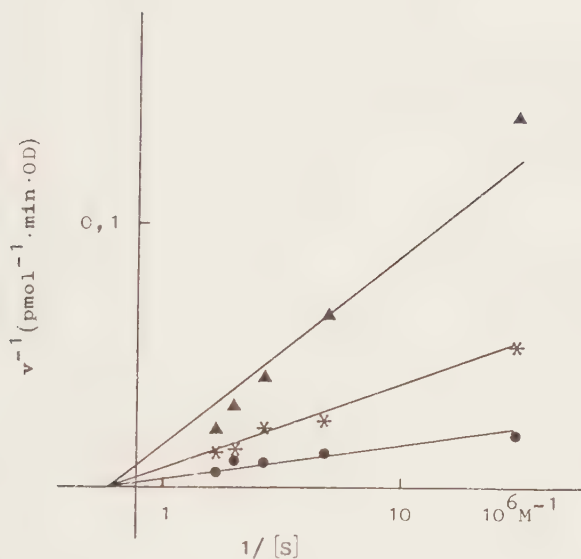


Abbildung 26 : Änderung des K_m von Glucose durch α -Methylglucosid bei adaptierten Bakterien.

Für die Glucosekonzentrationen von 70-340nM wurde der K_m von adaptierten Bakterien bestimmt.

(●) Kontrollansatz, (*) Ansatz mit 1,1mM α -MG und

(▲) Ansatz mit 9,6mM α -MG. Dabei fand man keine Änderung des

K_m durch die Zugabe von α -MG, aber eine Änderung von $v_{\max}$.

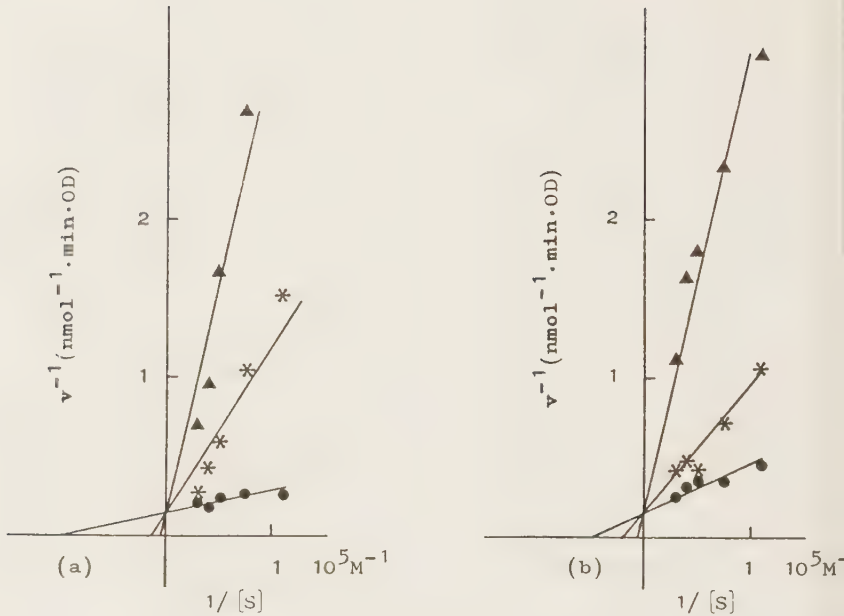


Abbildung 27 : Änderung des K_m von Glucose durch α -Methylglucosid bei Kontrollbakterien (a) und bei adaptierten Bakterien (b)

Für Glucosekonzentrationen von $1,4\text{--}34\mu\text{M}$ wurde der K_m bestimmt.

(a): (●) Kontrollansatz, (*) Ansatz mit $0,25\text{mM}$ α -MG und (▲) Ansatz mit $0,68\text{mM}$ α -MG. Dabei ergab sich für steigende α -MG Konzentrationen eine Vergrößerung des K_m , $v_{\max}$ blieb unverändert.

(b): (●) Kontrollansatz, (*) Ansatz mit $1,1\text{mM}$ α -MG und (▲) Ansatz mit 11mM α -MG. Dabei ergab sich für steigende α -MG Konzentrationen eine Vergrößerung des K_m jedoch keine Änderung von $v_{\max}$.

7. Bestimmung des K_m von α -Methylglucosid bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien

Kontrollbakterien und adaptierte Bakterien zeigten unterschiedliches Verhalten beim Glucosetransport. Jetzt sollte auch der Transport von α -Methylglucosid bei Kontrollzellen und bei adaptierten Zellen untersucht werden; dazu wurden der K_m und v_{max} von α -MG bestimmt.

Zur Bestimmung des K_m von α -MG wurden Aufnahmekinetiken von α -Methyl- ^{14}C -Glucosid gemessen. Dabei wurden Konzentrationen von 86-1600pM α -MG und 3,4-260pM α -MG eingesetzt. Für die kleinen Konzentrationen zeigte sich, daß die adaptierten Bakterien nur etwa halb soviel α -MG aufnahmen wie die Kontrollbakterien (Abbildung 28). Die Aufnahmegeschwindigkeit war bei den adaptierten Zellen ungefähr halb so groß wie bei den Kontrollzellen (Abbildung 29a). Der K_m von α -MG ließ sich bei diesen Konzentrationen für die Kontrollbakterien und für die adaptierten Bakterien nicht bestimmen (Abbildung 29b). Auch bei den Konzentrationen von 3,4-260pM α -MG nahmen die adaptierten Bakterien deutlich weniger α -MG auf als die Kontrollbakterien (Abbildung 30), und auch die Aufnahmegeschwindigkeit lag für die adaptierten Bakterien niedriger als für die Kontrollbakterien (Abbildung 31). Beim Auftragen nach Lineweaver-Burk (Abbildung 32) erhielt man für den K_m und für v_{max} folgende Werte (Tabelle 5):

Tabelle 5: K_m und $v_{\max}$ von α -Methylglucosid bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien

Kontrollbakterien		adaptierte Bakterien	
K_m (μM)	$v_{\max}$ (nmol/min·OD)	K_m (μM)	$v_{\max}$ (nmol/min·OD)
25	2	45	2,5
30	1,6	62	2,4
34	2,5	71	2,5

Bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien wurde in 3 unabhängigen Versuchen der K_m und $v_{\max}$ von α -Methylglucosid bestimmt. Dabei wurden α -Methylglucosidkonzentrationen von 3,4-260 μM eingesetzt.

Der K_m war für die adaptierten Bakterien etwa doppelt so groß, wie für die Kontrollbakterien; $v_{\max}$ war für Kontrollbakterien und für adaptierte Bakterien annähernd gleich. Für die Kontrollbakterien lag der K_m im Bereich der in der Literatur gefundenen Werte (6).

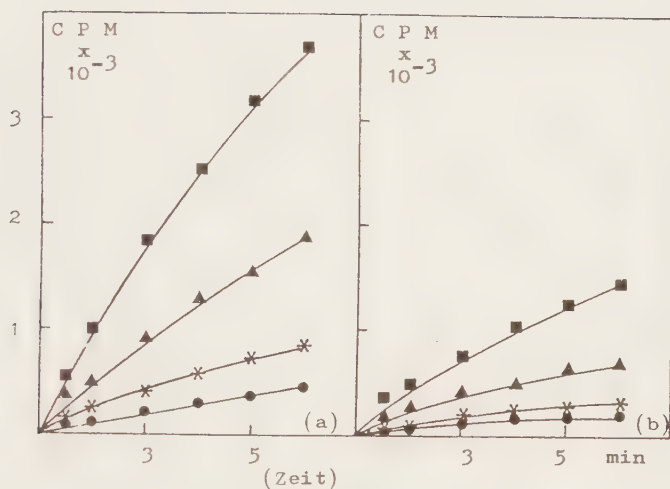


Abbildung 26 : Aufnahmekinetik von α -Methyl- ^{14}C -Glucosid bei Kontrollbakterien (a) und bei adaptierten Bakterien (b)

Bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien wurden Aufnahmekinetiken mit steigenden α -MG Konzentrationen gemessen. (●) 82pM, (*) 160pM, (▲) 330pM und (■) 820pM α -MG wurden eingesetzt.

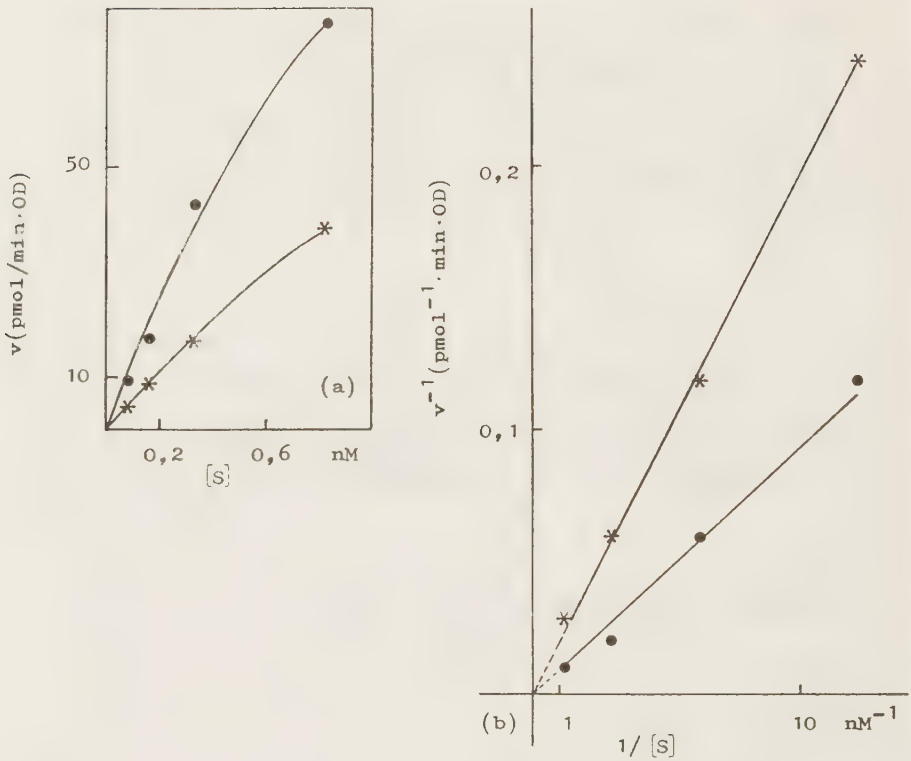


Abbildung 29a : Aufnahmegeschwindigkeit von α -Methylglucosid bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien

Für Konzentrationen von 82-820pM α -MG waren die Aufnahmegeschwindigkeiten bei den Kontrollbakterien (●) etwa doppelt so groß wie bei den adaptierten Bakterien (*).

Abbildung 29b : Bestimmung des K_m von α -Methylglucosid bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien

Für die Konzentrationen von 82-820pM α -MG ließ sich der K_m für die Kontrollbakterien (●) und für die adaptierten Bakterien (*) nicht bestimmen.

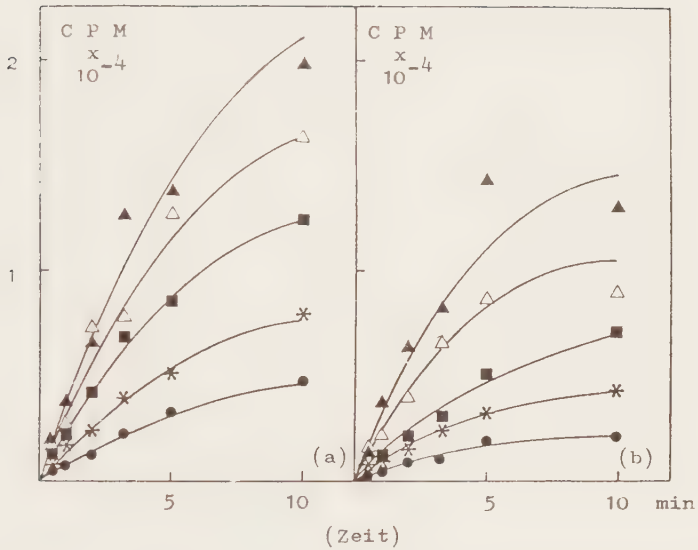


Abbildung 30 : Aufnahmekinetik von α -Methyl- ^{14}C -Glucosid bei Kontrollbakterien (a) und bei adaptierten Bakterien (b).

Bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien wurden Aufnahmekinetiken mit steigenden α -MG Konzentrationen gemessen. (●) 3,4 μM , (*) 7,5 μM , (■) 13,5 μM , (△) 20 μM und (▲) 32,7 μM α -MG wurden eingesetzt.

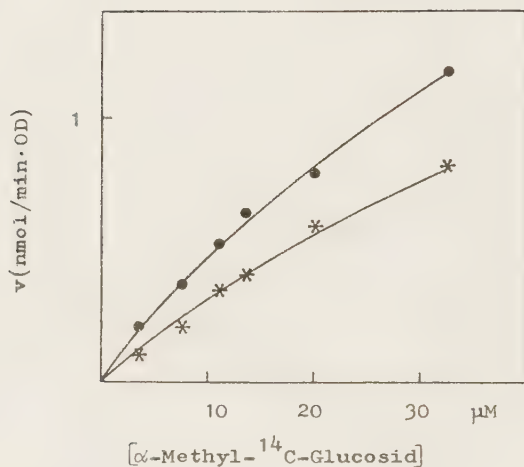


Abbildung 31 : Aufnahmegeschwindigkeit von α -Methylglucosid bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien

Für verschiedene α -Methylglucosid Konzentrationen wurden die Aufnahmegeschwindigkeiten bei Kontrollbakterien (●) und bei adaptierten Bakterien (*) bestimmt.

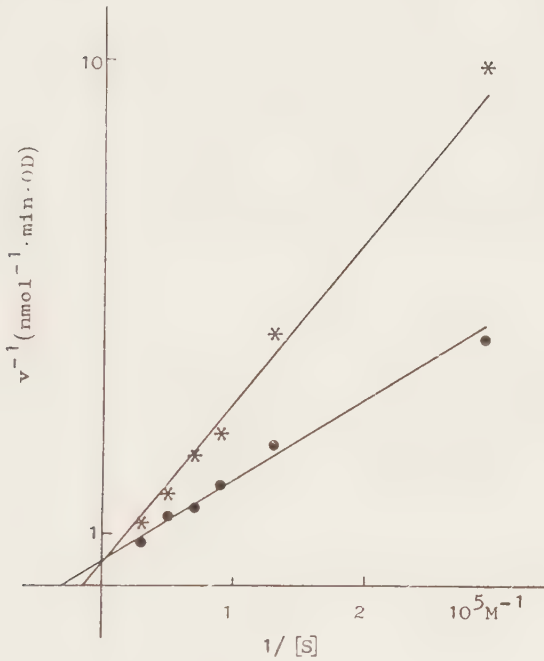


Abbildung 32 : Bestimmung des K_m von α -Methylglucosid bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien

Bei Konzentrationen von $3,4-32,7 \mu\text{M}$ α -MG ergab sich für die Kontrollbakterien (•) ein K_m von $34 \mu\text{M}$ und für die adaptierten Bakterien (*) ein K_m von $71 \mu\text{M}$. v_{max} war sowohl für die Kontrollbakterien als auch für die adaptierten Bakterien $2,5 \text{ nmol/min} \cdot \text{OD}$.

Jetzt sollte auch noch untersucht werden, wie sich die α -Methylglucosidaufnahme bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien durch Glucose hemmen ließ. Dabei schien sich anzudeuten, daß geringe Glucosekonzentrationen bei den Kontrollzellen die α -MG Aufnahme sogar steigerte, während dies bei den adaptierten Zellen nicht der Fall war. Insgesamt war eine quantitative Auswertung wegen einer zu großen Streuung jedoch nicht möglich.

8. Die Bildung von ppGpp nach Gabe von α -Methylglucosid

Es ist bekannt, daß E. coli auf Aminosäuremangel und Energiemangel mit der Bildung von ppGpp (Guanosin 5'-Diphosphat 2' (3')-Diphosphat) reagiert. Da α -MG in den Bakterien einen Energiemangel erzeugt, und die dadurch hervorgerufene Wachstumshemmung durch Zugabe von Aminosäuregemischen überwunden werden kann, wurde die Bildung von ppGpp nach Gabe von α -MG und bei adaptierten Zellen untersucht.

Zur Bestimmung der Nukleotide ATP, GTP und ppGpp wurde die Aufnahme von $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ in säurelösliches Material gemessen. Durch chromatographische Trennung konnten die einzelnen Nukleotide identifiziert werden (Abbildung 33). Für die einzelnen Nukleotide wurden folgende R_F Werte gefunden (Tabelle 6):

Tabelle 6: R_F Werte der chromatographisch getrennten Nukleotide

Nukleotid	R_F
ATP	0,7
GTP	0,6
ppGpp	0,4

Die Nukleotide wurden auf PEI-DC-Cellulose F Fertigplatten in 1,5M KH_2PO_4 (pH 3,4) getrennt.

Unter der Einwirkung von α -MG sammelte sich in den Bakterien das atypische Nukleotid ppGpp an. Die Akkumulation von ppGpp in den Zellen erreichte 3 Minuten nach der Zugabe von α -MG ein Maximum und fiel dann wieder ab. Diese Anhäufung von ppGpp unter der Einwirkung von α -MG (Abbildung 34) konnte durch Zugabe von Aminosäuregemischen weitgehend verhindert werden (Abbildung 35), wobei AS und AS-Leu in ihrer Wirkung Unterschiede zeigten (Tabelle 7).

Tabelle 7: Entstandene Menge ppGpp unter der Einwirkung von α -Methylglucosid und Aminosäuregemischen

Bedingungen	ppGpp (nmol $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ /OD)
Kontrolle	0,16
36mM α -MG	0,79
102mM α -MG	0,78
165mM α -MG	0,70
Kontrolle	0,33
102mM α -MG	1,7
102mM α -MG + AS	0,3
102mM α -MG + AS-Leu	0,84
Kontrolle	0,31
102mM α -MG	3,8
102mM α -MG + AS	0,62
102mM α -MG + AS-Leu	1,4

Die Bildung von ppGpp nach Gabe von α -Methylglucosid und Aminosäuregemischen wurde wie in II.7 beschrieben bestimmt.

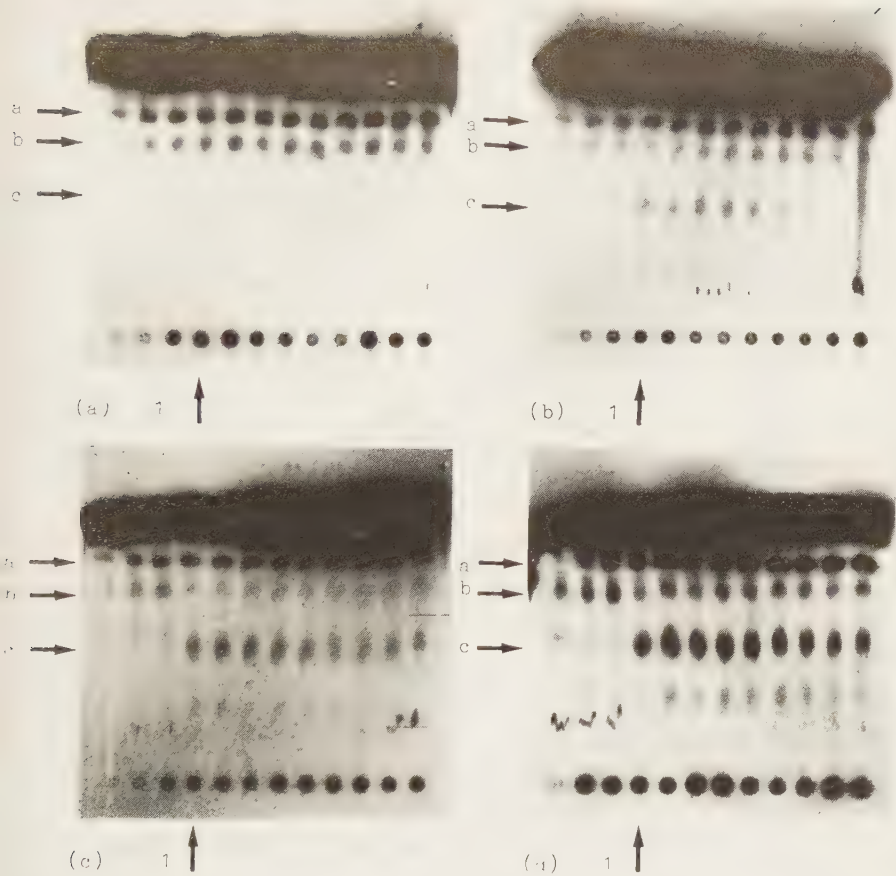


Abbildung 33 : Chromatographische Trennung der Nukleotide
ATP, GTP und ppGpp

Die Nukleotide ATP, GTP und ppGpp wurden chromatographisch getrennt. ATP wird durch den Pfeil a, GTP durch den Pfeil b und ppGpp durch den Pfeil c gekennzeichnet. Der Pfeil 1 markiert die erste Probe nach der Zugabe von α -MG.

- (a) Kontrollansatz, dem Wasser zugegeben wurde;
- (b) Ansatz, dem 36mM α -MG zugegeben wurde;
- (c) Ansatz, dem 102mM α -MG zugegeben wurde und
- (d) Ansatz, dem 165mM α -MG zugegeben wurde.

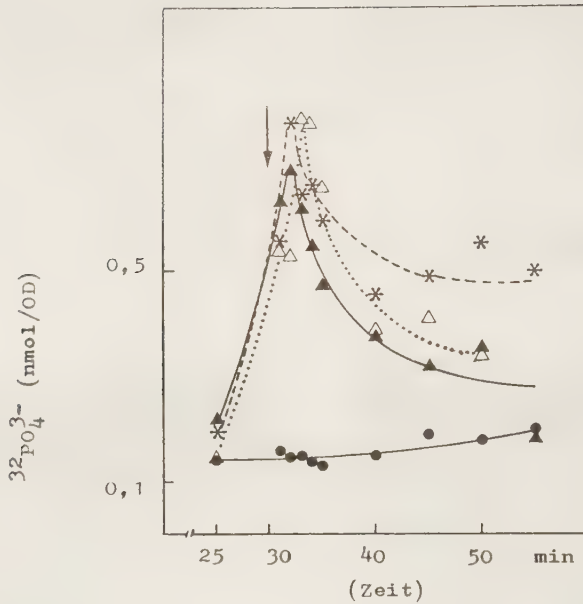


Abbildung 34 : Entstehung von ppGpp unter der Einwirkung von α -Methylglucosid

Die Bakterien wurden mit $^{32}\text{P}\text{-PPi}$ inkubiert. 30 Minuten nach dem Start wurde α -MG zugegeben (Pfeil).

(●) Kontrollansatz; (△) Zugabe von 36mM, (*) Zugabe von 102mM und (▲) Zugabe von 165mM α -MG.

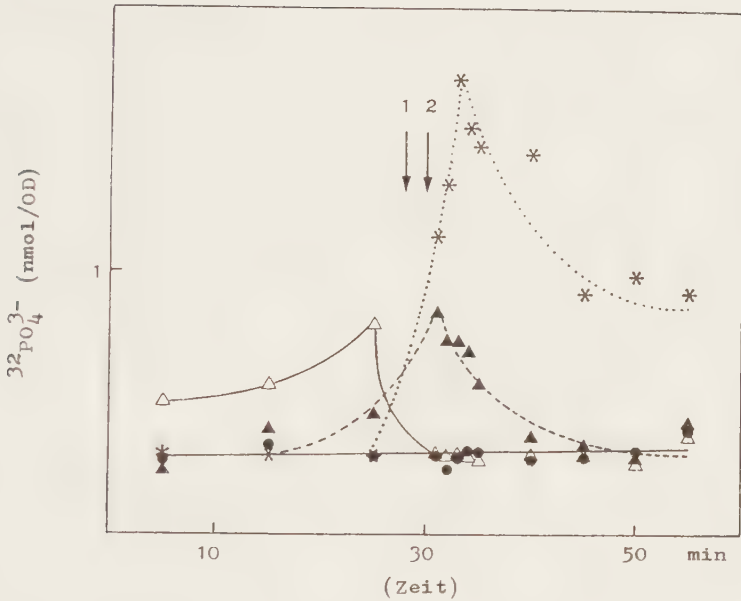


Abbildung 35 : Entstehung von ppGpp unter der Einwirkung von α -Methylglucosid und AS bzw. AS-Leu

Die Bakterien wurden mit $^{32}\text{P-OD-}$ inkubiert, 28 Minuten nach dem Start wurden Aminosäuregemische in einer Konzentration von 0,11mM zugegeben (Pfeil 1) und 30 Minuten nach dem Start α -MG (Pfeil 2). (●) Kontrollansatz; (*) Zugabe von 102mM α -MG; (△) Zugabe von AS und 102mM α -MG und (▲) Zugabe von AS-Leu und 102mM α -MG.

Nun wurde untersucht, ob in adaptierten Bakterien ebenfalls ppGpp unter der Einwirkung von α -MG entsteht. Zu diesem Zweck wurde die $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ -Aufnahme in säurelösliches Material bei $\text{OD}_{578} = 0,6$ bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien gemessen. Es zeigte sich, daß die adaptierten Bakterien im Gegensatz zu den Kontrollbakterien unter der Einwirkung von α -MG praktisch kein ppGpp ansammelten (Abbildung 36 und Tabelle 8).

Tabelle 8: Entstandene Menge ppGpp unter der Einwirkung von α -Methylglucosid bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien

	α -MG (mM)	ppGpp (nmol $^{32}\text{PO}_4^{3-}/\text{OD}$)
Kontrollbakterien	105	1,3
adaptierte Bakterien	105	0,26
	133	0,28
	164	0,27

Die Bildung von ppGpp nach Gabe von α -Methylglucosid wurde wie in II.7 beschrieben, bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien bestimmt; der Einbau von $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ erfolgte jetzt jedoch bei $E_{578} = 0,6$.

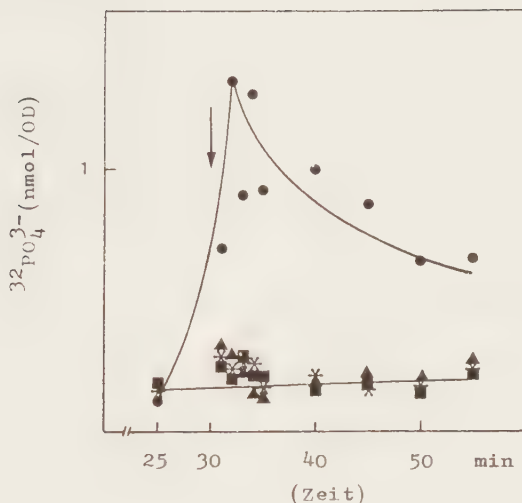


Abbildung 36 : Entstehung von ppGpp unter der Einwirkung von α -Methylglucosid bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien

Die Bakterien wurden bei $E_{578} = 0,6$ mit $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ inkubiert. 30 Minuten nach dem Start wurde α -MG zugegeben (Pfeil).
 (●) Kontrollbakterien, denen 105mM α -MG zugegeben wurde;
 (▲) adaptierte Bakterien, denen 105mM α -MG zugegeben wurde;
 (■) adaptierte Bakterien, denen 133mM α -MG zugegeben wurde und
 (*) adaptierte Bakterien, denen 164mM α -MG zugegeben wurde.

9. Unterschiede im Proteinmuster der inneren und äußeren Membran und des Cytosols bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien

Das unterschiedliche Verhalten von Kontrollbakterien und adaptierten Bakterien beim Glucosetransport und beim α -Methylglucosidtransport führte zu der Frage, ob sich das Glucose-transportsystem bei Kontrollzellen und bei adaptierten Zellen unterscheidet.

In den vorhergehenden Kapiteln wurden die Transportsysteme kinetisch charakterisiert. Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Kontrollbakterien und adaptierten Bakterien. Der Transport von Glucose und α -MG wird im wesentlichen von Membranproteinen geleistet. Es sollte untersucht werden, ob sich auch das Membranproteinmuster von Kontrollbakterien und adaptierten Bakterien unterscheidet. Dazu wurde bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien die innere und äußere Membran präpariert.

Die bei der Membranpräparation gewonnenen Proteine des Cytosols, der inneren und äußeren Membran wurden elektrophoretisch getrennt (II, 12). Dabei konnten 48 bzw. 36 Banden scharf voneinander getrennt werden. Das so gewonnene Ergebnis muß mit Einschränkungen betrachtet werden. Die Trennung erfolgte nur eindimensional, so daß die einzelnen Banden Überlagerungen mehrerer Proteine darstellen können; außerdem führt die Trennung auf einem anderen System vermutlich zu anderen Ergebnissen.

Die "Kaltpräparation" (II.10) wurde bei Kontrollbakterien (K) und bei adaptierten Bakterien (Ad) vorgenommen und man fand für folgende Molekulargewichte ein unterschiedliches Bandenmuster (Abbildung 37, Tabelle 9).

Tabelle 9: Unterschiede im Bandenmuster der inneren und äußeren Membran und des Cytosols

Innere Membran:	75800:	K > Ad
	68400:	K > Ad
	43600:	K < Ad
Äußere Membran:	52200:	K > Ad
	45900:	K > Ad
	25800:	K < Ad
Cytosol:	54300:	K > Ad

Bei den elektrophoretisch getrennten Proteinen des Cytosols und der inneren und äußeren Membran ergaben sich bei den Kontrollbakterien und bei den adaptierten Bakterien für die aufgeführten Molekulargewichte besonders deutliche Unterschiede.

Die Präparation von ^{35}S -Met markierten Bakterien wurde bei Kontrollbakterien (K), gehemmten Bakterien (G) und bei adaptierten Bakterien (Ad) vorgenommen (II.11). Nach der Trennung wurde zunächst eine Autoradiographie des Gels gemacht (Abbildung 38) und anschließend die einzelnen Banden ausgeschnitten und direkt mit 5ml Toluol-Szintillator gezählt. Die so gewonnenen Ergebnisse (C P M) wurden für G und Ad in Prozent der Kontrolle berechnet. Für die innere Membran ergab sich bei folgenden Molekulargewichten ein unterschiedliches Bandenmuster (Tabelle 10).

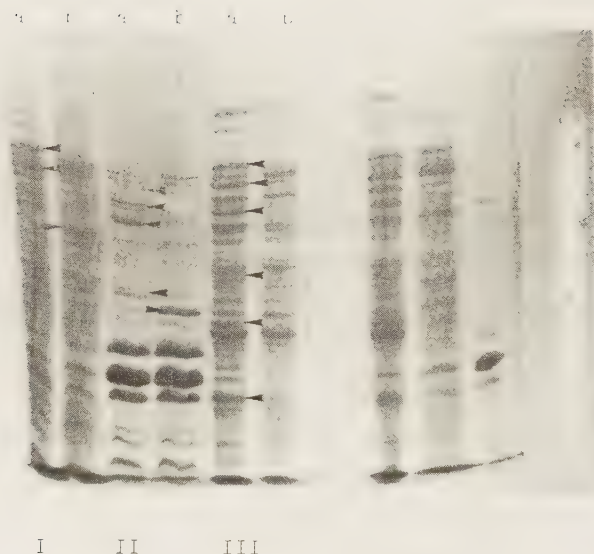


Abbildung 37 : Proteinmuster der inneren und äußeren Membran und des Cytosols bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien

Bei der elektrophoretischen Trennung der Proteine der inneren Membran (I), der äußeren Membran (II) und des Cytosols (III) ergaben sich folgende Unterschiede im Bandenmuster (Pfeile: ► Zunahme; ◄ Abnahme) bei Kontrollbakterien (a) und bei adaptierten Bakterien (b).

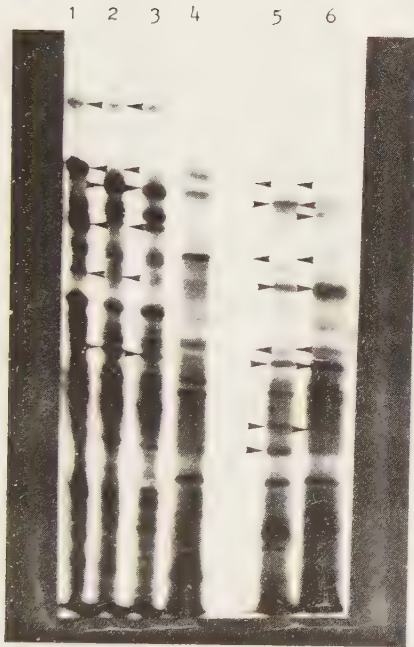


Abbildung 38 : Unterschiede im Proteinmuster der inneren Membran und des Cytosols bei Kontrollbakterien, bei gehemmten Bakterien und bei adaptierten Bakterien

Bei der Autoradiographie der ^{35}S -Met markierten Proteine der inneren Membran (4 - 6) und des Cytosols (1 - 3) ergaben sich deutliche Unterschiede im Bandenmuster (Pfeile: $\blacktriangleright$ Zunahme; $\blacktriangleleft$ Abnahme) bei den Kontrollbakterien (1,4), den gehemmten Bakterien (2,5) und den adaptierten Bakterien (3,6).

Tabelle 10: Unterschiede im Bandenmuster der inneren Membran

	G	Ad
Innere Membran: 92600:	20 %	30 %
81500:	140 %	80 %
66200:	70 %	100 %
61800:	10 %	40 %
54000:	130 %	160 %
40300:	70 %	160 %
36900:	190 %	190 %
35200:	70 %	130 %
33300:	140 %	220 %
19900:	100 %	50 %
16600:	50 %	60 %

Bei den radioaktiv markierten Banden ergaben sich für die genannten Molekulargewichte Unterschiede im Bandenmuster der inneren Membran. Das Ergebnis der Szintillationszählung wurde für die gehemmten Bakterien und für die adaptierten Bakterien in Prozent der Kontrolle berechnet.

Für die äußere Membran ergab sich kein unterschiedliches Bandenmuster. Für das Cytosol ergab sich bei folgenden Molekulargewichten ein unterschiedliches Bandenmuster (Tabelle 11).

Tabelle 11: Unterschiede im Bandenmuster des Cytosols

	G	Ad
Cytosol: 100600:	80 %	10 %
96100:	20 %	50 %
92900:	35 %	60 %
88700:	330 %	130 %
82900:	140 %	280 %
70000:	10 %	10 %
39100:	170 %	140 %
31900:	40 %	20 %
27800:	500 %	470 %
26900:	180 %	120 %
24200:	310 %	250 %
18300:	90 %	120 %

Bei den radioaktiv markierten Banden ergaben sich für die genannten Molekulargewichte Unterschiede im Bandenmuster des Cytosols. Das Ergebnis der Szintillationszählung wurde für die gehemmten Bakterien und für die adaptierten Bakterien in Prozent der Kontrolle berechnet.

Vergleicht man die Ergebnisse der Autoradiographie mit den Ergebnissen der Coomassie-Färbung, so findet man keine Übereinstimmung.

IV Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von α -Methylglucosid auf *E. coli* untersucht.

Es wurde gefunden, daß α -Methylglucosid eine Wachstumshemmung hervorruft. Die Stärke und Dauer der Hemmung ist sowohl von der α -Methylglucosidkonzentration im Medium als auch von der Glucosekonzentration abhängig. Die Wachstumshemmung ist reversibel, durch Zugabe von Glucose kann sie aufgehoben werden. Weiter wurde gefunden, daß die Hemmung durch Zugabe von Aminosäuregemischen überwunden werden kann, während einzelne Aminosäuren dies nicht bewirken. Auf Grund dieser Tatsache wurde untersucht und gefunden, daß die Bakterien nach der Gabe von α -Methylglucosid das atypische Nukleotid ppGpp bilden und daß die Bildung von ppGpp durch Aminosäuregemische weitgehend verhindert werden kann.

Es wurde entdeckt, daß sich die Bakterien an α -Methylglucosid gewöhnen können (ADAPTATION, erworbene Toleranz).

Eine Bakteriostase durch α -Methylglucosid ist für die Adaptation nicht erforderlich; hebt man die Wachstumshemmung durch ein Aminosäuregemisch auf, so adaptieren die Bakterien ebenfalls. Außerdem ist die Adaptation nicht von einer hemmenden α -Methylglucosidkonzentration im Medium abhängig, bereits subinhibitorische Konzentrationen bewirken eine Adaptation. Die Adaptation an α -Methylglucosid ist reversibel und wird nicht vererbt.

Um den Mechanismus zu klären, der zu der Adaptation führt, wurde das Glucosetransportsystem näher betrachtet. Es zeigte sich, daß die adaptierten Bakterien sehr viel mehr und schneller Glucose transportieren als Kontrollbakterien. Außerdem ist dieser Glucosetransport durch α -Methylglucosid bei adaptierten Bakterien sehr viel schlechter hemmbar als bei Kontrollbakterien. Im Gegensatz dazu transportieren die adaptierten Zellen α -Methylglucosid deutlich schlechter und langsamer als die Kontrollzellen. Beides spricht dafür, daß die Adaptation ein Transportphänomen ist. Die erzielten Ergebnisse lassen sich am besten deuten mit dem Vorhandensein mehrerer Transportsysteme für Glucose bzw. α -Methylglucosid. Das bzw. die Transportsysteme für Glucose passen sich "sinnvoll" an die Streßsituation an. Zwischen Glucose und dem Hemmstoff α -MG kann "besser" unterschieden werden.

Da Membranproteine den Glucosetransport leisten, wurde untersucht, ob sich im Proteinmuster der inneren und äußeren Membran bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien Unterschiede ergeben. Bei der Trennung der Proteine der Membranen fand man Unterschiede im Bandenmuster bei Kontrollbakterien und bei adaptierten Bakterien. Ob es sich bei diesen Unterschieden allerdings um das Korrelat für eine Änderung innerhalb des Glucosetransportsystems bei adaptierten Zellen handelt, bedarf weiterer Analysen.

V Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung des Hemmstoffs α -Methylglucosid (α -MG) auf *E. coli* bzw. auf das Glucose-transportsystem bei *E. coli*. α -MG wird von den Bakterien kompetitiv zur Glucose transportiert und phosphoryliert, kann aber nicht weiter metabolisiert werden. Auf diese Weise erzeugt es in den Bakterien einen Energiemangel, der zur Wachstumshemmung führt. Diese Wachstumshemmung ist von der Konzentration an α -MG und Glucose im Medium abhängig; sie ist reversibel, Zugabe von Glucose hebt die Wachstumshemmung auf. Beides läßt sich mit einer kompetitiven Transporthemmung der Glucose erklären. Diese Hemmung durch α -MG kann auch durch die Zugabe verschiedener Aminosäuregemische überwunden werden; eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß die Aminosäuren jetzt als Energiequelle dienen bzw. zur Gluconeogenese verwendet werden. Auf Grund dieser Tatsache wurde die Bildung von ppGpp nach Gabe von α -MG untersucht. Es ist bekannt, daß Aminosäuremangel in "stringent" Stämmen von *E. coli* die Produktion zweier atypischer Nukleotide hervorruft, die ursprünglich als "Magic Spots" bezeichnet wurden und als ppGpp (Guanosin-5'-Diphosphat-2'(3')-Diphosphat) und als pppGpp (Guanosin-Pentaphosphat) identifiziert wurden (2-4;10). 1971 wurde gefunden, daß sowohl "stringent" als auch "relaxed" Stämme von *E. coli* auf Energiemangel mit der Bildung von ppGpp reagieren (10). Dieser Feststellung entspricht das Ergebnis,

das hier gefunden wurde. Die Bakterien (MRE 600) bilden unter der Einwirkung von α -MG - das in der Zelle einen Energiemangel produziert - das Nukleotid ppGpp. Durch Zugabe von Aminosäuregemischen kann die Bildung von ppGpp eingeschränkt werden.

Die Bildung von ppGpp wird durch ein Aminosäuregemisch, dem Leucin fehlt, kaum unterdrückt; das deutet auf einen Zusammenhang zwischen ppGpp und unterbeladener tRNA^{Leu} hin (12). Weil offensichtlich kein Energiemangel mehr besteht, erzeugt die Zugabe von α -MG in adaptierten Bakterien auch kein ppGpp. Für das Auftreten der Adaptation an α -MG sind mehrere Erklärungen denkbar.

Erstens wäre möglich, daß die adaptierten Bakterien durch eine Enzymneubildung die Methylgruppe abspalten und dann die entstandene Glucose weiterverarbeiten können. Diese Möglichkeit schien wenig wahrscheinlich und wurde nicht untersucht.

Die zweite Möglichkeit ist, daß es bei den adaptierten Bakterien zu Änderungen innerhalb des Glucosetransportsystems kommt. Dabei käme in Frage, daß die Gesamtkapazität des Glucosetransportsystems erhöht wird; außerdem wäre denkbar, daß die Glucoserezeptoren innerhalb des Transportsystems so geändert werden, daß adaptierte Zellen zwischen Glucose und α -MG unterscheiden können.

Grundsätzlich ist auch an die Möglichkeit zu denken, daß es sich bei den adaptierten Bakterien um die Selektion einer Mutante handelt. Die Reversibilität der Adaptation spricht allerdings gegen eine genetische Fixierung - es scheint eine erworbene Eigenschaft zu sein.

Bevor auf die Klärung des Mechanismus der Adaptation weiter eingegangen wird, soll kurz das Glucosetransportsystem näher betrachtet werden.

Für *E. coli* ist zur Verwertbarkeit einer Reihe von Hexosen die Aktivität eines phosphoenolpyruvatabhängigen Phosphotransferasesystems nötig (8; 17):

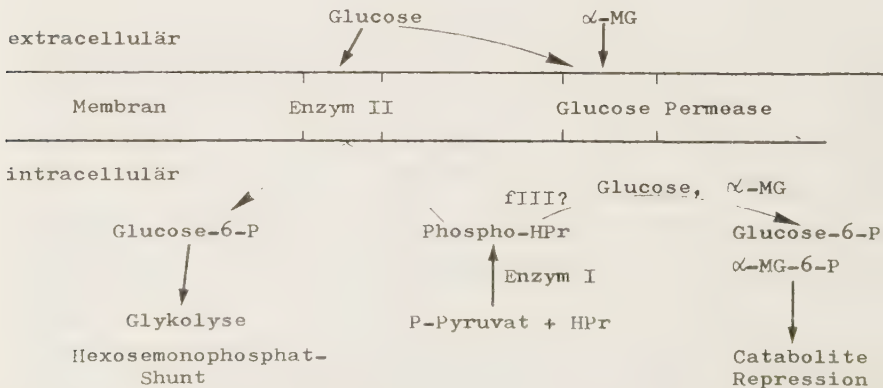


In diesem System katalysiert das Enzym I (Reaktion (1)) den Transfer der Phosphatgruppe vom Phosphoenolpyruvat zum Stickstoffatom eines proteingebundenen Histidin in einem kleinen Protein (HPr). Das Enzym II (Reaktion (2)) katalysiert den Transport vom phosphorylierten Protein (Phospho-HPr) zu seiner spezifischen Hexose. Für die Verwertbarkeit von Glucose scheinen neben diesen vier Komponenten noch weitere Faktoren eine Rolle zu spielen, z.B. Lipoproteine beim Transport durch die Membran (18).

Enzym I und HPr liegen ausschließlich im Cytoplasma vor, während Enzym II, das nicht nur aus einem Protein besteht, membrangebunden ist (9; 17). Obwohl für einen schnellen Glucose-transport das Enzym I nötig ist, können auch Mutanten, denen dieses Enzym fehlt, mit Glucose als Energiequelle wachsen (1).

Auf Grund dieser Tatsache wird angenommen, daß ein zweites Transportsystem für Glucose existiert - das Glucose Permease System, das den Glucosetransport über erleichterte Diffusion oder aktiven Transport ermöglicht (1). Glucose, die über das Permease System in die Zelle gelangt, wird mit Hilfe von Phospho-HPr intracellulär phosphoryliert.

Bisher wurde angenommen, daß Glucose und α -Methylglucosid über das von Phosphoenolpyruvat abhängige Phosphotransferase System (Transportsystem I) in die Zelle gelangen (17). Jetzt stellte man fest, daß beide Transportsysteme unterschiedliche Substratspezifität besitzen. Während Glucose über das Transportsystem I und über das Permease System (Transportsystem II) in die Zelle transportiert wird, geschieht der Transport von α -Methylglucosid hauptsächlich über das Transportsystem II (1).



Hypothetisches Schema des Glucosetransports in *E. coli* (siehe 1)
 Glucose-6-P = Glucose-6-Phosphat, P-Pyruvat = Phosphoenolpyruvat,
 α -MG-6-P = α -Methylglucosid-6-Phosphat, fIII = Faktor III,

Um die Frage nach dem Mechanismus der Adaptation zu klären, wurden Aufnahmekinetiken von Glucose und α -MG gemessen. Dabei wurden für Glucose in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration zwei verschiedene K_m für den Glucosetransport gefunden - was für zwei verschiedene Transportsysteme für Glucose spricht. Daß adaptierte Bakterien die Methylgruppe des α -MG abspalten können, ist vermutlich nicht der Fall - auch subinhibitorische Konzentrationen an α -MG führen zur Adaptation, so daß diese wohl hauptsächlich über eine Änderung im Transportsystem entsteht. Glucose wird von den adaptierten Bakterien besser und schneller transportiert, dies spricht für eine Änderung innerhalb des Transportsystems. Vermutlich beruht die Adaptation jedoch nicht bzw. nicht nur auf einer Erhöhung der Gesamtkapazität des Transportsystems, denn α -MG wird von adaptierten Zellen schlechter als von Kontrollzellen transportiert. Beide Ergebnisse sprechen dafür, daß es sich um eine Änderung der Rezeptoren handelt, so daß adaptierte Zellen jetzt zwischen Glucose und α -MG unterscheiden können und infolgedessen weniger α -MG in die Zelle transportieren. Für eine derartige Änderung spricht auch, daß bei adaptierten Bakterien die Glucoseaufnahme durch α -MG schlechter hemmbar ist als bei Kontrollbakterien.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Adaptation wohl hauptsächlich auf einer Änderung der Rezeptoren innerhalb der Glucosetransportsysteme beruht. Die Erhöhung der Gesamtkapazität des Glucosetransportsystems scheint - wenn überhaupt - eine geringe Rolle zu spielen, denn dann müßten Glucose und α -MG von den adaptierten Zellen gleichermaßen besser transportiert werden.

Bei der Membranpräparation von Kontrollbakterien und adaptierten Bakterien wurden im Proteinmuster der inneren und äußeren Membran und des Cytosols Unterschiede gefunden. Diese Unterschiede der Bandenmuster stehen vielleicht in einem Zusammenhang mit den diskutierten Änderungen im Glucosetransportsystem bei adaptierten Bakterien. Beides bedarf weiterer eingehenderer Untersuchungen, die das Thema weiterer Arbeiten sein können.

Literaturverzeichnis

- (1) Bourd, G.I., Erlagaeva, R.S., Bolshakova, T.N. and Gershanovitch, V.N. (1975) *Eur. J. Biochem.* 53, 419-427
- (2) Cashel, M. and Gallant, J. (1969) *Nature* 221, 838-841
- (3) Cashel, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 3133-3141
- (4) Cashel, M. and Kalbacher, B. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 2309-2318
- (5) Deuber, Heinz, Dissertation Erlangen (1983)
- (6) Gachelin, G. (1970) *Eur. J. Biochem.* 16, 342-357
- (7) Kornberg, H.L. and Reeves, R.E. (1972) *Biochem. J.* 128, 1339-1344
- (8) Kundig, W., Ghosh, S. and Roseman, S. (1964) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 52, 1067
- (9) Kundig, W. and Roseman, S. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1407-1418
- (10) Lazzarini, R.A., Cashel, M. and Gallant, J. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 4381-4385
- (11) Lugtenberg, B., Meijers, J. Peters, R., Hoek, v.d.P. and Alphen, v.L. (1975) *FEBS LETTERS* 58, 254-258
- (12) Lund, E. and Kjeldgaard, N.O. (1972) *Eur. J. Biochem.* 28, 316-326
- (13) Nakada, D. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 103, 455-465
- (14) Ogilvie, A., Lämmermann, M., Wiebauer, K. and Kersten, W. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 395, 136-145
- (15) Ogilvie, A., Wiebauer, K. and Kersten, W. (1975) *Biochem. J.* 152, 517-522
- (16) Ogilvie, A., Wiebauer, K. and Kersten, W. (1975) *Biochem. J.* 152, 511-515

- (17) Roseman, S. (1969) J. Gen. Physiol. 54, 138s
- (18) Roseman, S. (1975) Ciba Found. Symp. 31 (New Ser.):
Energy Transformation in Biological Systems, 225-238
- (19) Simoni, R.D., Levinthal, M., Kundig, F.D., Kundig, W.,
Anderson, B.E., Hartman, P.E. and Roseman, S. (1967)
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 57, 1963
- (20) Spratt, B.G. (1977) Eur. J. Biochem. 72, 341-352

Herrn Prof. Dr. A. Ogilvie danke ich
recht herzlich für die Überlassung
des Themas, die Anregungen und die
klärenden Gespräche. Seine verständ-
nisvolle Betreuung war eine große
Hilfe.

Herrn Prof. Dr. W. Kersten danke ich
für die Arbeitsmöglichkeit in seinem
Institut und für sein reges Interesse
an der Arbeit.

Lebenslauf

Name	Gabriela Bullmer, geb. Müller
Geboren	am 3. September 1953 in Oberkirch
Eltern	Friedrich Müller und Ehefrau Ingeburg, geb. Barth
Beruf des Vaters	Blechnermeister
Schulen	1960 - 1964 Volksschule in Gerabronn 1964 - 1965 Gymnasium in Bietigheim 1965 - 1973 Mädchengymnasium im Haal in Schwäbisch Hall
Schulabschluß	Abitur 1973
Studium	4 Semester Physik 1973 - 1975 Universität Erlangen-Nürnberg 12 Semester Medizin 1975 - 1981 Universität Erlangen-Nürnberg
Prüfungen	Ärztliche Vorprüfung im Sommer 1977 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung im Sommer 1978 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung im Sommer 1980 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung im Herbst 1981
Eheschließung	mit Helmut Bullmer, Studienrat z.A. am 31. März 1980
Geburten	Monika am 24. November 1981 Albert am 6. Juni 1983

